

ETABLIERUNG EINES KRYOCHIRURGISCHEN BEHANDLUNGSVERFAHRENS AN KNOCHENGeweBE MITTELS MINIATURKRYOSONDEN UND ERSTE KLINISCHE ERGEBNISSE BEI OSTEOSARKOMEN

DOMINIK BLÄCKER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär- Anatomie, -Histologie und –Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen,

Betreuer Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

und

dem Institut II für Anatomie und dem Institut für Experimentelle Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln,

Betreuer Prof. Dr. J. Koebe

**Etablierung eines kryochirurgischen Behandlungsverfahrens
an Knochengewebe mittels Miniaturkryosonden
und erste klinische Ergebnisse bei Osteosarkomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr.med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dominik Bläcker

Tierarzt aus Kirchen/Sieg
(Rheinland-Pfalz)

Gießen 2009

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold
Prof. Dr. J. Koebeke**

Tag der Disputation: 19.02.2009

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Ziel der Arbeit	1
1.3	Wahl des Versuchstieres.....	2
1.4	Versuchskriterien.....	3
1.5	Geschichtliches.....	3
1.5.1	Entwicklung der Kryochirurgie.....	3
1.5.2	Experimentelle Studien	6
1.5.3	Klinische Anwendung	10
1.6	Einführung in die Kryochirurgie	15
1.6.1	Physikalische Vorgänge bei der Kryochirurgie.....	15
1.6.1.1	Friereigenschaften von reinem Wasser	15
1.6.1.2	Der Gefrierpunkt	16
1.6.1.3	Die Kristallisation	16
1.6.1.4	Friereigenschaften von Lösungen	17
1.6.2	Grundlagen der Kryochirurgie (Gage, 1998; Baust, 1998)	20
1.6.2.1	Unmittelbare Zellschädigung	20
1.6.2.2	Verzögerte Zellschädigung	21
1.6.3	Die kryochirurgische Technik	22
1.6.3.1	Die Frierrate	22
1.6.3.2	Die Gewebetemperatur.....	22
1.6.3.3	Die Frierzeit.....	22
1.6.3.4	Die Taurate	23
1.6.3.5	Die Wiederholung des Frier-Tau-Zyklus	23
1.6.4	Funktionsweise von Kryogeräten	24
1.6.4.1	Kühlmittel.....	24
1.6.4.2	Möglichkeiten der Kälteerzeugung	25
1.6.4.3	Temperaturregistrierung	25
1.7	Aufbau moderner Kryotherapiegeräte	26

1.7.1	Basiseinheit.....	26
1.7.2	Aufbau der Kryosonden	26
1.7.3	Aufbau des Erbe-Cryo 6.....	27
1.8	Stabilitätsprüfungen.....	30
2	Tiere, Materialien und Methoden	31
2.1	Versuchsaufbau und Durchführung.....	31
2.2	Operationsdurchführung.....	32
2.2.1	Femur.....	32
2.2.2	Tibia.....	33
2.3	Magnetresonanztomographie	33
2.4	Röntgendiagnostik.....	34
2.5	Testung der biomechanischen Belastbarkeit	34
2.6	Histologie	35
2.6.1	Knochenmarker	35
2.6.2	Trenn-Dünnschliff-Technik (Sandwich-Technik) nach Donath und Breuner (1989).	36
2.7	Stabilitätsprüfung	41
2.7.1	Versuchsaufbau	42
2.7.1.1	Mechanische Prüfung der Femora.....	42
2.7.1.2	Mechanische Prüfung der Tibiae.....	43
2.7.2	Statistik.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Stabilitätsprüfung	46
3.2	Histologie	58
3.2.1	Histologische Auswertung.....	59
3.2.1.1	2-Monats-Gruppe – Femur.....	59
3.2.1.2	2-Monats-Gruppe – Tibia.....	60
3.2.1.3	4-Monats-Gruppe – Femur.....	62
3.2.1.4	4-Monats-Gruppe – Tibia.....	63
	6-Monats-Gruppe – Femur.....	65
3.2.1.6	6-Monats- Gruppe – Tibia.....	66

3.3	Praktische Anwendung der Kryochirurgie zur Behandlung eines Osteosarkoms – Fallberichte	67
3.3.1	Fallbericht 1	67
3.3.2	Fallbericht 2	84
3.3.3	Fallbericht 3	87
4	Diskussion.....	92
4.1	Histologie	93
4.2	Fallbeispiele.....	94
5	Zusammenfassung	98
6	Hinweise.....	100
6.1	Hinweis auf Teilpublikation	100
6.2	Beurteilung Histologie Fallbericht 1	100
7	Literatur	101
8	Abkürzungsverzeichnis.....	110
9	Danksagung.....	113

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Das Gebiet der Kryochirurgie ist in zahlreiche medizinische Therapien zumeist als unterstützende Therapieform eingeflossen. Die Möglichkeiten, mittels Kälte unterschiedlichste Krankheiten behandeln und heilen zu können, sind vielfältig. Um so erstaunlicher ist es, dass die Kryobehandlung nur von sehr wenigen Chirurgen und Orthopäden als Therapieform eingesetzt wird und das Forschungsbedürfnis auf diesem Feld sehr groß ist.

Besonders, wenn alternative Therapieformen fehlen oder ohne Kältebehandlung nur radikalchirurgische Eingriffe zur Heilung oder palliativen Versorgung vorgenommen werden können, ist die Kryochirurgie eine zusätzliche Möglichkeit, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. So ist es möglich, durch die Knochenkryochirurgie Amputationen zu vermeiden und damit die distal der Erkrankung gelegenen, gesunden Skelettabschnitte zu erhalten. Im Idealfall ist es möglich, Knochentumore in situ zu zerstören, dabei das Grundgerüst des Knochens zu erhalten und als Korpus für den Neuaufbau von Knochengewebe zu verwenden.

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Erprobung neuester kryochirurgischer Verfahren in geschlossenen Systemen mit neuartigen Miniaturkryosonden am Knochengewebe unter besonderer Berücksichtigung der Veränderung der Knochenstabilität im zeitlichen Verlauf sowie die Erarbeitung histologischer Verlaufskriterien.

Das herkömmliche Verfahren der Vereisung am Knochen bestand in einem offenen System. Hierbei wurde flüssiger Stickstoff in die Knochenhöhle gegossen oder gesprüht. Zwangsläufig ergab sich durch die mangelhafte Steuerbarkeit ein Verlust von vitalem Knochengewebe. Die Stabilität des Knochens wurde unnötig geschwächt.

Bei der Verwendung eines geschlossenen Systems älterer Bauart mit Kryosonde wurde die Steuerbarkeit zwar erheblich verbessert, jedoch war die iatrogene Schwächung des Knochens beim Einbringen der Sonde erheblich, da die Sondengröße im Vergleich zur Kühlleistung einen großen Durchmesser in Anspruch nahm.

Bei den von uns verwendeten neuartigen Miniaturkryosonden ist der Durchmesser der Sonde und korrespondierend dazu der Kortikalisdefekt beim Einbringen deutlich geringer. Zudem ist der Gefriervorgang durch die hohe spezifische Frierleistung und extrem schnelle Abkühlung dieser Sonden exakt steuerbar.

Im Tierversuch sollte der Erfolg der kryochirurgischen Behandlung, der Zeitverlauf der Heilung und die damit verbundene mögliche Bruchgefährdung untersucht werden. Dem Knochengewebe kommt als Zielorgan entscheidende Bedeutung zu, da die Lebensqualität der Patienten durch Vermeidung von Amputationen sowohl in physischer als auch psychologischer Hinsicht entscheidend verbessert wird. Die Funktion betroffener Extremitäten kann, im Gegensatz zu anderen Methoden, vollständig wiederhergestellt werden oder sie ist zumindest nur in geringerem Umfang eingeschränkt. Die Amputation von Gliedmaßen als therapeutische oder palliative Maßnahme stellt sowohl funktionell als auch mental eine große Belastung für den Patienten dar.

Weiterhin sollten histologische Kriterien zur Beurteilung gesunden Knochengewebes nach kryochirurgischer Behandlung erarbeitet werden, um später das Randgebiet eines abladierten Tumors histologisch besser beurteilen zu können. Zusätzlich werden erste klinische Ergebnisse nach Kryoablation von Osteosarkomen vorgestellt.

1.3 Wahl des Versuchstieres

Im Vorfeld musste überlegt werden, inwieweit es möglich und durchführbar ist, ein möglichst genaues und auf den Menschen (oder auch das Tier) übertragbares Modell zu entwickeln, um genaue Aussagen über Vor- und Nachteile sowie Risiken dieser Methode treffen zu können.

Um eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen Human- und Tiergewebe zu erreichen und gleichzeitig die Durchführbarkeit des Experiments zu gewährleisten, wurden Schafe als Versuchstiere gewählt. Die Wahl fiel aufgrund der ähnlichen biomechanischen Statik und der Festigkeit des Knochengewebes auf ein größeres Säugetier. Experimentelle Studien an Ratten und Kaninchen liegen vor, jedoch treten sie als Vergleichsmodell zum Menschen oder anderen großen Säugetieren aufgrund ihrer unterschiedlichen Biostatik und Biomechanik des Knochens in den Hintergrund.

Andere, dem Menschen ähnliche Säuger wie Schweine wurden aufgrund mangelnder oder erschwelter Zugangsmöglichkeit zum Knochen ausgeschlossen. Da die Tiere über einen

Zeitraum von 6 Monaten versorgt und behandelt werden mussten, erschien sowohl aus Kostengründen als auch aus Gründen der Handhabbarkeit das Schaf als ideales Versuchstier.

1.4 Versuchskriterien

Ein Hauptaspekt ist die sichere Abtötung des zu operierenden Gebietes in vivo und dessen Nachweis. Mittels immunhistochemischer Bestimmung der Apoptose sollte im Rahmen einer anderen Dissertation bewiesen werden, dass das betroffene Gebiet sicher zerstört werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind z. Z. zur Publikation eingereicht.

Des Weiteren bestand ein Hauptaugenmerk auf der Wiedererlangung des Ursprungszustandes. Hierzu wurde die Regenerationsfähigkeit des kryochirurgisch veränderten Gewebes verfolgt und die Belastbarkeit des Knochens im Vergleich zum unbehandelten Knochengewebe in verschiedenen Zeitintervallen bestimmt. Mittels Fluorochrommarkierungen können die Regenerationsstadien histologisch aufgearbeitet und zeitlich eingegrenzt werden.

Im Ergebnisteil werden drei Fallbeispiele vorgestellt. Es handelt sich in allen Fällen um Hunde mit Osteosarkomen; zwei Tiere mit Osteosarkom im Bereich des distalen Radius und ein Tier mit Osteosarkom am distalen Femur. Eine konventionelle Behandlung der Osteosarkome durch Amputation wurde vom Besitzer abgelehnt und die Einwilligung zur experimentellen kryochirurgischen Behandlung gegeben. In einem Fall wurde im Anschluss an die kryochirurgische Behandlung eine Radio-Chemotherapie eingeleitet.

Im Bereich der Komplikationen wurde die Gefahr der Thromboembolien vor allem im Lungengewebe näher untersucht. Im direkten Umfeld der gesetzten Läsion wurde der Einfluss auf das umliegende Muskel- und Nervengewebe sowie auf das hämodynamische System festgestellt. Durch Kernspinanalyse wurden das Aufkommen von Ödemen und das Verhalten des Knochenmarks im Wundgebiet registriert. Die Ergebnisse dieser Teilaspekte sind Teil einer anderen Dissertation und wurden bereits publiziert.

1.5 Geschichtliches

1.5.1 Entwicklung der Kryochirurgie

Das Ziel, Kälte therapeutisch zu nutzen, geht zurück bis ins 19. Jahrhundert. 1807 wurde erstmals von Dominique Jean Larrey, Napoleons Leibarzt, über schmerzfrei durchgeführte

Amputationen von Gliedmaßen während des Winterfeldzuges unter kalten Witterungsbedingungen berichtet (Larrey, 1832).

Erst ein knappes halbes Jahrhundert später wurde von James Arnott über die Kältetherapie in der Krebsbehandlung berichtet. Er behandelte Uterus- und Mammakarzinome durch direkten Kontakt eines Eisgemisches mit der Tumoroberfläche. Dabei beobachtete er sowohl eine Schmerz- als auch eine Massenreduktion des Gewebes (Arnott, 1851).

Über die Jahre entwickelten sich die ersten Kältesysteme, die es möglich machten, Gewebe gezielt zu behandeln. Dabei handelte es sich um halboffene Systeme, bei denen das Kühlmittel in direktem Kontakt mit dem Gewebe stand.

Die ersten Kryosonden wurden 1901 von White erfunden, der Aluminiumzylinder, die mit flüssiger Luft gefüllt waren, in das Tumorgewebe einführte (White, 1901).

Ebenfalls 1901 wurde es durch Dewar erstmals möglich, Kühlflüssigkeiten über einen gewissen Zeitraum mittels vakuumisolierter Behälter zu lagern.

Das erste halbgeschlossene Kryosystem, in dem die Kryosonden erstmals mittels eines zirkulierenden Eisgemisches gekühlt wurden, erfand Fay (Fay, 1959).

Erst 1961 entwickelte Tytus (1961) das erste geschlossene Kühlsystem unter Verwendung von Freon. Im gleichen Jahr stellten Cooper und Lee ihr erstes geschlossenes Kryosystem unter Verwendung von flüssigem Stickstoff vor, wie es vom Prinzip her auch heute noch verwendet wird (Cooper und Lee, 1963). Dabei wird die Kryosonde mittels eines vakuumisolierten Schlauches aus einem Stickstofftank gespeist und dabei auf -190° C abgekühlt.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die historische Entwicklung der Kryochirurgie (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die historische Entwicklung der Kältetherapie

Jahr	Autor	System/Kühlmittel	Temp. °C	Indikation
1807	Larrey		ohne Angabe	Amputation von Gliedmaßen
1851	Arnott	Eis/Kochsalzgemisch in Metallbehältern	-18° C	Fortgeschrittenes Uterus- und Mammakarzinom
1883	Openchowski	Niedertemperatursystem mit Äther	ohne Angabe	ohne Angabe
1901	White	flüssige Luft als Spray	ohne Angabe	Hautkarzinom / Zungentumore
1901	Dewar	Erste vakuumisolierte Behälter zur Aufbewahrung der Kühlmittel		
1907	Pusey	Kohlendioxidschnee	ohne Angabe	Hautkarzinom
1938	Fay / Henny	Eisbeutel; Hypothermie	ohne Angabe	Metastasierende Karzinome
1959	Fay	Eis/Kochsalzgemisch, erstes halbgeschlossenes System	bis -50° C	Maligne Tumore aller Art
1959	Rowbotham	Alkohol/Kohlendioxid-Aceton-Gemisch	-74° C	Maligne Tumore aller Art
1961	Tytus	Erstes geschlossenes System, Freon	-40° C	Hirngewebe, Leber, Hypophyse
1961	Cooper / Lee	Geschlossenes System, flüssiger Stickstoff	-190° C	Kryothalamektomie
1963	Kelman / Cooper	ohne Angabe	ohne Angabe	Katarakt, Netzhautablösung
1969	Marcove / Miller	Halboffenes System, flüssiger Stickstoff	-190° C	Knochentumore

Besonders bei der Bekämpfung von Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich wurde die Kryochirurgie in den zurückliegenden Jahren eingesetzt, so dass viele Arbeiten zur Grundlagenforschung sowie klinischen Anwendung aus dem Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Fachgebiet stammen.

Häufige Anwendung scheint die Kryochirurgie ebenfalls im russischsprachigen Raum zu finden, was zahlreiche wissenschaftliche Veröffentlichungen belegen. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der russischen Übersetzung sind die Forschungsergebnisse leider nicht leicht verfügbar, so dass im Überblick nur die gängige englischsprachige Literatur genutzt werden konnte.

1.5.2 Experimentelle Studien

Gage und Emmings (1967) führten erste Frierungen an Unterkiefer- und Femurknochen von Kaninchen durch. Dabei verwendeten sie einen spiralartig um den Knochen gelegten Schlauch, durch den flüssiger Stickstoff geleitet wurde. Die auf diese Weise behandelte Knochen bildeten im Verlauf von etwa 1 Woche eine uniforme Knochennekrose mit scharfer Demarkation zum Gesunden im Bereich der 0° C-Grenze aus. Schon wenige Tage später kam es dann zu einer reparativen Knochenneubildung, ausgehend von vitalem Knochen und Periost an der Grenze des kryochirurgisch behandelten Segments zum Gesunden. Nach einem Monat fand sich histologisch bereits eine dünne, subperiostal gelegene Schicht aus trabekulärem Knochen, die das gesamte avitale Knochensegment überzog. Nach 4 Monaten war das gesamte avitale Gewebe abgebaut und durch Wachstum der trabekulären Knochenschicht durch Kompaktknochen ersetzt. Die Dauer der Umbauvorgänge nahm insgesamt ein Jahr in Anspruch.

Hausamen et al. (1973) führten Frierversuche an Rattenkiefen und Tibiaknochen von Kaninchen durch. Bereits nach 2 Wochen konnten röntgenologisch Veränderungen der Knochensubstanz in Form von Periostverdickungen an den Enden der gefrorenen Segmente dargestellt werden, die sich im weiteren Verlauf über das gesamte Segment erstreckten. Die Kortikalis des kryobehandelten Knochens blieb zunächst über die ersten 4 Wochen unverändert, um dann im weiteren Verlauf, ausgehend von subperiostalen Resorptionszonen, über einen Zeitraum von 8 Wochen komplett durch neuen Knochen ersetzt zu werden.

Gage et al. (1966) berichteten zuvor bereits über ähnliche radiologische Veränderungen bei der Frierung von Hundefemora, deren Heilung sich über 6 Monate hinzog.

Kuylenskierna et al. (1981) berichteten nach mikroangiografischen Untersuchungen an Unterkieferknochen von Kaninchen bereits nach 30 Minuten nach Kryobehandlung von einer Stase der Blutversorgung im betroffenen Gebiet, welche sich in Kürze weiter ausbreitete und nach 48 Stunden auch die umliegenden Weichteile mit einbezog. Daraus wurde gefolgert, dass die Ischämie einen wesentlichen Bestandteil in der Ausbildung der Kryonekrose darstellt. Zwei Wochen nach Behandlung begann die Rekanalisation der Havers Kanäle ausgehend von in den Markraum einspritzenden Gefäßen. In weiteren Studien stellten die Autoren mittels Fluorochrommarkierung des Knochens die Regenerationsfähigkeit des ossären Gewebes dar. Die Revitalisierung ging im Wesentlichen übereinstimmend mit den

Mikroangiographiebefunden von der Markraumseite des Knochens aus und erreichte ihr Maximum zwischen der 4. und 8. Woche post OP.

Da Umbauvorgänge an Knochen zwangsläufig Änderungen der Biomechanik des behandelten Gewebes nach sich ziehen, ist es von großer Bedeutung, Untersuchungen über die Knochenstabilität nach derartigen Eingriffen durchzuführen.

Fisher et al. (1978) belegten in Studien an Rattenunterkiefern eine maximale Reduktion der Knochenstabilität von etwa 30%, gemessen am Ausgangswert 8 Wochen nach kryochirurgischer Behandlung. Eine vollständige Stabilität konnte 4 Monate post OP wieder erreicht werden.

Auch Gage et al. (1966) zeigten, dass das Auftreten von Spontanfrakturen in einer Hundestudie zum Zeitpunkt der maximalen Knochenumbauvorgänge nach Ablauf des 2. Monats am höchsten war.

Bradley et al. (1975) definierten drei wesentliche Phasen als Reaktion des Knochens auf Kältebehandlung: Nekrose, Osteogenese und Remodelling. Weiterhin führten sie Untersuchungen zur klinischen Anwendung verschiedener kryochirurgischer Techniken in der Behandlung von Kiefertumoren durch. Als Methode der Wahl definierten sie die Applikation von flüssigem Stickstoff in Form eines Kältesprays.

Mit Ziel einer Optimierung der Kälteapplikation stellen Kerschbaumer et al. (1980) die Ergebnisse einer zweiteiligen tierexperimentellen Studie vor, bei denen die Frierungen unter anderem mittels geschlossener Experimentalsonden durchgeführt wurden. Im ersten Teil wurden verschiedene Formen der Stickstoffapplikation miteinander verglichen, wobei die intramedulläre Frierung mit einer leicht gebogenen, nach V-förmiger Osteotomie in den Knochen eingebrachten Kryosonde die geringsten Nebenwirkungen zeigte. Im zweiten Teil der Studie zeigte sich unter anderem, dass die Heilung einer Osteotomie in einem kryochirurgisch behandelten Bereich stark verzögert ist und dass in diesem Bereich angebrachte Plattenosteosynthesen durch Ausriss der Schrauben aus dem Knochen versagen können. Bei zwei Tieren kam es zu einer Osteomyelitis, so dass die Autoren eine perioperative antibiotische Abdeckung empfehlen.

Eine weitere Komplikation nach kryochirurgischer Behandlung ist das Auftreten von Knochenmarksembolien, die de Vries (1983) erstmals beschrieb. Als Folge einer intramedullären Druckerhöhung durch die sich ausbreitende Eisfront kann es zum Auftreten von Knochenmarksembolien kommen. Demgegenüber steht eine hämodynamische

Untersuchung von Kerschbaumer et al. (1982), die während Kryoablation im Tierversuch keinen Hinweis auf klinisch relevante Lungenembolien fanden.

Auch außerhalb des Gebietes der Tumorchirurgie fand die Kältetherapie Einzug in den chirurgischen Bereich.

Marciani et al. (1986) führten Versuche an Kiefergelenken von Affen durch, um eine neue Behandlungsmöglichkeit für schmerzhafte Kiefergelenksarthrosen zu entwickeln.

Lenz und Preussler (1975) sowie Schneider (1981) untersuchten die kryochirurgischen Effekte am wachsenden Knochen und konnten belegen, dass Frierungen im Bereich der Epiphysenfugen zu einem partiellen oder vollständigen Wachstumsstillstand durch vorzeitigen Schluss der Epiphysenfugen führen. Es resultierten Varus- oder Valgusdeformitäten der betroffenen Extremität.

Müller et al. (1985) stellten an einem Osteosarkommodell an Mäusen die kryochirurgische Behandlung mit einer lokalen Resektion sowie der Amputation der Extremität gegenüber. Dabei zeigten die kryochirurgisch behandelten Mäuse weniger Lokalrezidive als die Resektionsgruppe und eine geringere Metastasierungsrate als die Amputationsgruppe. Man folgerte daraus, dass es einen immunologischen Effekt gegenüber den Tumorzellen geben müsste, der durch die kryochirurgische Behandlung induziert wird.

Malawer et al. (1988) untersuchten den Effekt von flüssigem Stickstoff versus Knochenzement auf normalen Knochen sowie den Durchbau von eingebrachter Spongiosa anhand eines simulierten Tumors in Form einer Knochenhöhle. Hierbei zeigte sich, dass durch die Kältebehandlung eine Nekrosezone von 7-12 mm um die Höhle herum erzeugt wurde, während um den Knochenzement keine Nekrose entstand. Die Inkorporierung der in die Knochenhöhle eingebrachten Spongiosa war nach Stickstoffbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Frierung deutlich verzögert, was die Autoren mit einer mikrovaskulären Thrombosierung und nachfolgender ischämischer Infarzierung erklären.

Auch Yun et al. (1993) bestätigten die Studienergebnisse von Malawer. Sie wiesen nach, dass die Nekrosezone nach Kryobehandlung die maximale Ausdehnung mit 14 mm vom Resektionsrand weg erreichte, gefolgt vom Knochenzement mit 2,8 mm (hitzebedingt beim Aushärten des Zements). Ohne Erfolg hinsichtlich Ausbildung einer Nekrose blieb die Applikation von Phenol.

Keijser et al. (1999) stellten entgegen theoretischen Erwartungen am Kaninchenmodell fest, dass die Minderung des Blutflusses im zu operierenden Gewebe mittels eines Tourniquets keine signifikante Vergrößerung der Nekrosezone zur Folge hatte.

Robinson et al. (2001) untersuchten an 16 humanen Knochentumoren (6 Chondrosarkome, 8 Metastasen und 2 Riesenzelltumore) die Wirkung von Frierzyklen auf die Tumurvitalität. Verwendet wurde ein Kryosystem auf der Basis von Argongas. Nach Curettage des Tumors und folgender kryochirurgischer Behandlung wurde an 5 unterschiedlichen Stellen die Tumurvitalität mittels einer quantitativen histologischen Evaluation bestimmt. Bereits der erste Frierzyklus von 5 Minuten bei -40°C ließ die Zellvitalität auf 5% des Ausgangswertes sinken. Dieser Wert konnte durch einen zweiten Frierzyklus nochmals deutlich gesenkt werden. Ein dritter Frierzyklus hingegen hatte keinen verringenden Effekt mehr auf die Zellvitalität. Somit reichen 2 Frierzyklen für eine ausreichende kryoablative Wirkung aus.

Im Bezug auf die Knochenheilung nach Kryoablation untersuchten Keijser et al. (2002) 62 Ziegen. Es sollte die Auswirkung einer Spongiosaplastik auf einen schnelleren Heilungsverlauf gezeigt werden. Bei den Ziegen wurde im Bereich der femoralen Diaphyse eine definierte Kryoablation nach Ausbohren eines Knochenzylinders gesetzt. Der Hälfte der Tiere wurde nach Frierung autologe Spongiosa aus dem Sternum in den Defekt eingesetzt. Nach 0, 4, 7, 10, 13, 16 und 26 Wochen wurden die Tiere getötet und die betroffenen Femora computertomographisch, histologisch und biomechanisch (Torsionsstabilität) aufgearbeitet. Sowohl die Knochenneubildung als auch die Knochenstabilität waren in beiden Gruppen gleich und die Spongiosa nach 10 Wochen resorbiert. Daraus folgerten die Autoren, dass eine Spongiosaplastik keinen Einfluss auf den Heilungsverlauf hat.

Pogrel et al. (2002) jedoch revidierten diese These zumindest für die Kryobehandlung von Kieferknochen. Neun Yucatan-Minischweinen wurden Läsionen am Unterkieferknochen durch Einbringen von flüssigem Stickstoff gesetzt. Bei einem Teil der Tiere wurde anschließend eine autologe Spongiosaplastik durchgeführt. Nach 3 Monaten zeigte sich in der Gruppe ohne Spongiosaplastik bei der Hälfte der Tiere eine Sequesterbildung mit verzögerter Wundheilung, während in der Gruppe mit Spongiosaplastik eine erhöhte Rate an Knochenneubildung nachgewiesen werden konnte. Hieraus folgte die Empfehlung, dass zumindest bei Behandlung im Kieferbereich mit einer anschließenden Spongiosaplastik bessere Heilungserfolge erzielt werden können.

Popken et. al. (2001) untersuchten Art und Ausbildung der Eiskristalle in Schweine- und Menschenlebern sowie in Lebermetastasen beim Menschen unter Verwendung neuartiger

Miniaturkryosonden. Durch den Vergleich zwischen der Ausbreitung der Eiskristalle einer 8-mm-Kryosonde zur neuartigen 3-mm-Kryosonde konnte im Lebergewebe eine bessere präoperative Planung und zielgenauere OP-Durchführung mit einer maximalen Ausbreitung der Kristalle von 31 mm zirkulär um die Sonde bei der neuen Miniaturkryosonde und maximaler Ausbreitung von 44 mm bei herkömmlichen Sonden gewährleistet werden.

Erstmals untersuchten Popken et. al. (2003) die Einwirkung von Miniaturkryosonden auf Knochengewebe in vitro und in vivo. Hierbei wurde die Kühlleistung im Vergleich von einer Sonde versus zwei Sonden optisch und thermisch zwischen Knochengewebe und einem Referenzgel verglichen. In vivo wurde mittels Messfühlern die Kühlleistung an Femur und Tibia des Schafes gemessen. Bei Verwendung zweier Sonden trat ein synergistischer Effekt ein, der die Expansion der Eiskristalle förderte; jedoch traten auch bei Verwendung nur einer Sonde im Umkreis von 1 cm Temperaturen von unter -50°C auf. Histologisch konnte der Zelltod bis in die -10°C -Gefrierzone nachgewiesen werden.

Popken et. al. (2004) testeten neue Miniaturkryosonden am Schafmodell. Im Umkreis von 1 cm um die Sonde konnte eine Temperatur von maximal -50°C erreicht werden, bei Verwendung zweier Sonden konnte durch synergistische Effekte die Temperatur auf -71°C gesenkt werden.

Je mehr Frierzyklen durchgeführt wurden, desto schneller sank die Temperatur des umliegenden Gewebes. Eine sichere Ablation des kryochirurgisch behandelten Knochens in der Frierzone konnte histologisch bewiesen werden. Durch die Einwirkung mehrerer Sonden konnte die Kryozone deutlich erweitert werden.

1.5.3 Klinische Anwendung

Auch in die klinische Anwendung hat die orthopädische Kryochirurgie Einzug gehalten. Sie kommt besonders dann zur Anwendung, wenn gängige Verfahren keine Aussicht auf Erfolg mehr bringen können oder wenn die einzige Alternative die Amputation der betroffenen Extremität ist. Sie stellt somit eine wertvolle palliative Maßnahme dar; aber auch im therapeutischen Bereich können gute Heilungserfolge erzielt werden.

Die erste kryochirurgische Behandlung eines Knochentumors beim Menschen wurde von Marcove (1964) durchgeführt. Der Patient litt an einer schmerzhaften, strahlenresistenten Knochenmetastase eines Bronchialkarzinoms. Nach Knochenfensterung und Curettage des Tumors wurde mittels eines Stahltrichters Gelfoam in die Knochenhöhle eingebracht.

Anschließend wurde über den Trichter flüssiger Stickstoff zugeführt, der den Gelfoam frieren ließ und dies den Knochen abdichtete. Durch die Operation konnte beim Patienten Schmerzfreiheit erzielt und eine palliative Amputation umgangen werden. Beflügelt durch den guten klinischen Verlauf wurden die Indikationen dieser Behandlungsmethode von Marcove (1968, 1969) bald auch auf primär gutartige Knochentumore wie aneurysmatische Knochenzysten und Riesenzelltumore sowie wenig maligne Chondrosarkome ausgedehnt.

Es folgten zwei weitere Studien von Marcove (1973, 1978), bei denen insgesamt 52 Patienten kryochirurgisch behandelt wurden (hauptsächlich Riesenzelltumore). Bei klinisch und radiologisch unauffälligem Verlauf wurden bei allen Patienten Second-Look-Biopsien entnommen. Bei 12 von 52 Patienten konnten vitale Tumorreste nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich, dass kryochirurgisch bedingte Nervenläsionen reversibel waren. Marcove et al. (1977) operierten 18 Patienten mit Chondrosarkomen in gleicher Weise. Bei 12 Patienten kam es zu Komplikationen; 6 Patienten mussten nach Rezidivbildung erneut chirurgisch versorgt werden. Bei den anderen 6 Patienten kam es zu Spontanfrakturen. Insgesamt mussten bei 7 der 18 Patienten ablative Maßnahmen durchgeführt werden, jedoch blieben alle Patienten bis auf einen über einen Beobachtungszeitraum von 66 Monaten rezidivfrei.

Marcove et al. (1977) waren es auch, die als erste die Kryochirurgie als ergänzendes Verfahren bei der osteosynthetischen Versorgung pathologischer Frakturen bei metastasiertem Nierenzellkarzinom einsetzten und dabei eine gute lokale Tumorkontrolle erzielen konnten.

Oeseburg (1978) verwendete die gleiche Technik wie Marcove bei der Behandlung von 5 Patienten mit aneurysmatischen Knochenzysten. Er versuchte, den chirurgischen Sicherheitsabstand mit Hilfe der Kältetechnik nach Curettage zu vergrößern und somit Substanzverlust am Knochen zu vermeiden. Die Knochenhöhle wurde nach Kryobehandlung mit Spongiosa aufgefüllt. Alle behandelten Patienten blieben über den Beobachtungszeitraum von 35 Monaten rezidivfrei.

Eine neue Technik führten Popescu und Spirescu (1980) ein. Sie propagierten die extrakorporale Vereisung, bei der 4 Patienten mit Unterkiefer Tumoren der betroffene Mandibularanteil entfernt, dann in flüssigen Stickstoff verbracht und reimplantiert wurde. Bei 2 Patienten verlief die Revitalisierung des Knochens problemlos; die anderen 2 Patienten erlitten in Folge schwere Infektionen im betroffenen Gebiet.

Einen weiteren Fortschritt erzielten Mirra et al. (1981), die zum ersten Mal die Kryochirurgie in unmittelbarer Umgebung zum Rückenmark einsetzten. Bei einem Patienten mit Riesenzelltumor des zweiten Halswirbels führten sie eine kombinierte kryochirurgische und radiotherapeutische Behandlung ein. Zum Erstaunen der Autoren konnte der komplette Wirbelkörper ohne Affektion des Rückenmarks gefroren werden. Man vermutete, dass die Liquorflüssigkeit isolierende Eigenschaften aufweist. Nach 53 Monaten war der Wirbelkörper komplett durchbaut und der Patient rezidivfrei.

Über Ergebnisse einer Langzeitstudie bei der Behandlung verschiedener Tumortypen am Knochen mittels Kryotherapie berichtet Marcove (1982; Tabelle 2):

Tabelle 2: Ergebnisse einer Langzeitstudie (Marcove 1982)

Tumortypisierung	Anzahl Patienten	Rezidivrate
Riesenzelltumor	102	2
Einkammerige Knochenzyste	23	2
Aneurysmatische Zyste	33	2
Chondroblastom	18	3
Ossäres Fibromyxom	4	0
Fibröse Dysplasie	7	0
Eosinophiles Granulom	4	0

Marcove (1984) war es ebenfalls, der die ersten 3 Patienten mit Osteosarkom kryochirurgisch behandelte. Bestätigt wurde die Tumorfreiheit (Second-Look-Biopsie) bei allen 3 Patienten; ein Patient erlitt eine unbeherrschbare Infektion, die zum Verlust der betroffenen Extremität führte. Bei einem weiteren Patienten wurden weitere Operationen aufgrund von Lungenmetastasen nötig. Alle Patienten blieben 38 Monate nach Behandlung tumorfrei.

Im weiteren Verlauf behandelte Marcove auch 7 Patienten mit Riesenzelltumoren des Sakrums (Curettage und Kryochirurgie bei 4 Patienten; Teilresektion und Kryochirurgie bei 3 Patienten). Alle Patienten waren nach einer medianen Beobachtungszeit von 12,25 Jahren erkrankungsfrei. Vier Patienten mussten wegen lokaler Rezidive erneut kryochirurgisch behandelt werden, blieben danach aber rezidivfrei.

Nach der Entwicklung neuer Geräte wurde die Kryochirurgie auch im Bereich kleinerer Knochen eingesetzt. Gartman und Ranawat (1984) behandelten erfolgreich ein rezidivierendes Osteoidosteom am Fingergrundglied nach vorheriger Curettage.

Meals et al. (1989) therapierten den Riesenzelltumor eines Metakarpalknochens nach Curettage und anschließender Spongiosaauffüllung. Eine Parästhesie durch Schädigung des umliegenden Nervengewebes bildete sich im Zeitraum von 6 Monaten komplett zurück.

Sheth et al. (1995) konnten zeigen, dass durch die Kryoablation von Riesenzelltumoren am distalen Radius bei erhaltener Handgelenksfunktion eine mit der Resektion vergleichbare lokale Tumorkontrolle erreicht werden konnte.

Athanasian (1999) behandelte einen Patienten mit therapieresistenter aneurysmatischer Knochenzyste am Fingergrundglied mittels Curettage, Kryochirurgie und Spongiosaauffüllung. Die Knochenzyste heilte vollständig aus.

Russe et al. (1984) stellten eine alternative Methode vor, bei der mit geschlossenen Kryosonden gearbeitet wurde. Es handelte sich dabei um gebogene, trokarartige, sowie kugel- und halbkugelförmige Konstruktionen, die über zusätzlich angelegte Knochenfenster außerhalb des tumortragenden Abschnitts (Trokarsonden) bzw. nach Curettage des Tumors (Kugelsonden) in den Knochen eingebracht wurden.

Für den Bereich der Pädiatrie berichteten Malaver et al. (1991) von 25 Patienten mit benignen Knochentumoren, die kryochirurgisch versorgt wurden. Die Lokalrezidivrate betrug 4% bei einem funktionell guten Ergebnis von 90%. Marcove (1995) behandelte 52 pädiatrische Patienten mit aneurysmatischen Knochenzysten mittels Curettage und Kryochirurgie, wobei nach 85 Monaten 82% der Patienten rezidivfrei waren. Nach kryochirurgischer Behandlung der Rezidivpatienten konnte insgesamt eine Heilungsrate von 92% erzielt werden. Schreuder et al. (1997) behandelten 42 pädiatrische Patienten mit einfachen Knochenzysten mittels Curettage und Vereisung; die Rezidivrate betrug nach 24,5 Monaten 5%.

Pogrel et al. (1993) erzielten eine Heilungsrate von 100% bei 37 Patienten mit Unterkiefertumoren unterschiedlicher Genese mittels Vereisung. Die Nachbeobachtungszeit betrug hierbei 75 Monate.

Salmassy et al. (1995) wiesen nochmals den besseren Heilungserfolg bei kryochirurgischer Behandlung des Unterkiefers nach Curettage und Spongiosaplastik nach. Von 20 behandelten Patienten, von denen 10 ohne Spongiosaplastik behandelt worden waren, erlitten 2 Patienten postoperative Frakturen, wohingegen bei den Patienten mit Spongiosaplastik keine Frakturen zu verzeichnen waren.

Schreuder et al. (1995) berichteten über das Auftreten venöser Stickstoffembolien durch Einsprühen des Stickstoffs in 2 Fällen und erklärten dies durch intravenöse Verdampfung

inkorporierten Stickstoffs und konsekutiver Verlegung der Lungenstrombahnen durch Stickstoffblasen. Die mutmaßlichen Embolien ließen sich bei beiden Patienten gut beherrschen und blieben ohne Konsequenzen. Zur Vermeidung solcher Komplikationen empfehlen die Autoren eine ausreichend weite Eröffnung der Knochenhöhle, um ein Einfangen von sich ausdehnendem Stickstoff innerhalb der Markhöhle zu vermeiden.

Aboulafia (1994) beschrieb die Technik von Curettage, Kryochirurgie und anschließender mechanischer Stabilisierung als Alternative zur Gelenkresektion bei ausgedehnten, subchondral reichenden, kniegelenksnahen Tumoren. Von 9 behandelten Tumoren (6 Riesenzelltumore, 1 Chondroblastom, 1 Chondrosarkom, 1 Fibrosarkom) kam es im Verlauf von 103 Monaten zu einem Rezidiv, das gleichermaßen nachbehandelt wurde. Bei allen Patienten blieb die Gelenkfunktion uneingeschränkt erhalten; zwei Patienten erlitten durch die Behandlung leichte Knorpelschäden.

Alkalay et al. (1996) behandelten bei Riesenzelltumoren mit eingetretener intraartikulärer Fraktur zunächst die Fraktur und danach den Tumor kryochirurgisch.

Schreuder (1997) verwendete erstmals Temperaturmessfühler zur besseren Kontrolle des Friervorgangs. Es konnte gezeigt werden, dass durch ein Stickstoffspray innerhalb von 10,7 sec an der Knochenoberfläche eine Temperatur von -50° C erreichbar war.

Schreuder (1998) veröffentlichte eine Studie von 22 Patienten mit Enchondromen und niedrig malignen Chondrosarkomen, die nach Kryoablation 26 Monate später alle rezidivfrei waren.

Malawer et al. (1998) berichten in einer Langzeitstudie von 102 Patienten mit einem durchschnittlichen Follow-Up von 6,5 Jahren nach kryochirurgischer Behandlung von Riesenzelltumoren. Bei einer Rezidivrate von 15,9% konnten nach Weiterbehandlung 100 von 102 Patienten geheilt werden.

Sampson und Pogrel (1999) publizierten eine Studie mit 20 Patienten mit intraossären Ameloblastomen im Bereich des Unterkiefers, von denen 11 mit Curettage und 9 mit Curettage und Kryoablation behandelt wurden. Während alle 11 Patienten ohne Kryoablation ein Rezidiv erlitten, waren alle 9 Patienten mit Kryoablation rezidivfrei..

Pogrel (2001) publizierte eine Studie von 26 Patienten mit odontogenetischen Keratozysten, die alle mittels Curettage und Kryochirurgie behandelt wurden. Von diesen Patienten mit Rezidiven waren bereits 22 mittels Curettage vorbehandelt worden. Von den 26 Patienten waren nach 3,5 Jahren 23 Patienten ohne Rezidiv, 3 Patienten erlitten im Median von 1,6 Jahren ein Lokalrezidiv.

Keijser et al. (2001) untersuchten im gleichen Jahr das funktionelle Ergebnis eines Kollektivs von 20 Patienten mit insgesamt 32 Manifestationen von fibröser Dysplasie anhand verschiedener Scores nach, die mit Curettage, Kryochirurgie und Knochenspongiosa behandelt worden waren. Der mediane Nachbeobachtungszeitraum betrug 6 Jahre. Es zeigte sich, dass sowohl die Patienten mit monoostotischem als auch polyostotischem Befall ein gutes funktionelles Outcome aufwiesen, während alle Patienten mit McCune-Albright-Syndrom ein schlechtes funktionelles Ergebnis zeigten.

Wittig et al. (2001) berichteten über 3 Patienten mit Riesenzelltumor im Bereich des Handskeletts, die kryochirurgisch behandelt wurden. Alle Patienten blieben über einen Zeitraum von 3 Jahren rezidivfrei. Bis auf eine leichte Wundinfektion heilten alle Läsionen per primam ab.

Boons et al. (2002) veröffentlichten eine Studie von 36 Patienten mit Riesenzelltumor, die unterschiedlich behandelt wurden. Gruppe 1 wurde radikal operiert und der Tumor großflächig reseziert. In Gruppe 2 wurde eine schonendere Resektion gewählt mit anschließender Kryobehandlung. Zwar waren alle Patienten aus Gruppe 1 nach 7 Jahren rezidivfrei, waren aber im Vergleich zur Gruppe 2 mit einer niedrigen Rezidivrate wesentlich schlechter im Bereich der Funktionalität.

1.6 Einführung in die Kryochirurgie

1.6.1 Physikalische Vorgänge bei der Kryochirurgie

1.6.1.1 Friereigenschaften von reinem Wasser

Wasser ist der Hauptbestandteil vitaler Gewebe und dient im Wesentlichen als Lösungsmittel für eine Vielzahl von Substanzen, die wiederum für die Zellvitalität und -integrität unverzichtbar sind. Wenngleich reines Wasser im Vergleich zur Zellflüssigkeit andere physikalische Eigenschaften aufweist, so ist die Kenntnis des Frierverhaltens von reinem Wasser Grundvoraussetzung für das Verständnis der Auswirkungen von Abkühlung, Frierung und Tauen auf lebende Zellen. Daher sollen zunächst die physikalischen Vorgänge bei der Frierung von Wasser näher beleuchtet und diese anschließend den Abläufen bei der Frierung von Zellflüssigkeit und Gewebe gegenübergestellt werden.

Wasser existiert in drei Phasen: gasförmig, flüssig und fest (kristallin). Jede Phase ist durch eine bestimmte Temperatur und einen bestimmten Druck determiniert. Unter dem Dampfdruck versteht man den Druck, bei welchem bei einer gegebenen Temperatur die Dampfphase mit der jeweiligen festen, respektive flüssigen Phase im Gleichgewicht steht. Jede Veränderung des Drucks führt zu einer Verschiebung des Gefrier- und Siedepunktes. Erhöht sich der Druck, so ist die Möglichkeit der Wassermoleküle zur Verdampfung reduziert, so dass erst über eine Energiezuführung in Form einer Temperaturerhöhung dennoch ein Verdampfen möglich ist. Einen weiteren wichtigen Aspekt repräsentiert die thermale Leitfähigkeit, da die Wärme/Kälte sich durch flüssige und gefrorene Anteile während des Frier- bzw. Tauvorganges bewegen muss. Die thermale Leitfähigkeit von Eis verändert sich mit der Temperatur und ist größer als die von flüssigem Wasser, welches als thermaler Isolator fungiert (Franks, 1982).

1.6.1.2 Der Gefrierpunkt

Obwohl 0°C im Allgemeinen als Gefrierpunkt von reinem Wasser bei atmosphärischem Druck bezeichnet wird, erfolgt die Initialisierung der Eisbildung erst bei Temperaturen unterhalb von 0°C . Bei genau 0°C kommen Eiskristalle und flüssiges Wasser nebeneinander vor und befinden sich im „Gleichgewicht“, so dass man auch vom sogenannten „äquilibrierten Gefrierpunkt“ spricht. Damit es zum Übergang von Wasser in den festen Aggregatzustand kommen kann, muss das System auf Temperaturen unterhalb des „äquilibrierten Gefrierpunktes“ abgekühlt werden. Mit Beginn der Kristallisation von reinem Wasser erhöht sich die Temperatur des Gemisches aus flüssiger und fester Phase auf 0°C und die Temperatur verbleibt auf diesem Niveau, bis der flüssige Wasseranteil vollständig zu Eis konvertiert ist. Ein weiterer Abzug von Wärme resultiert in einem Absinken der Eistemperatur. Die Temperaturdifferenz zwischen 0°C und der Temperatur, an dem die Kristallisation des Systems begonnen hat, bezeichnet das Ausmaß des „Supercooling“, d. h. das Vorliegen von flüssigem Wasser unterhalb des Gefrierpunktes. In reinem Wasser liegt das Limit für ein Supercooling bei -39°C , da es erst bei dieser Temperatur zu einer einheitlichen Kristallisation kommt (Franks, 1982).

1.6.1.3 Die Kristallisation

Die Kristallisation bedingt eine Erniedrigung der Temperatur, die als Kühl- oder als Frierrate angegeben werden kann. Die Kühlrate bezeichnet die Temperaturveränderung pro Zeiteinheit ($^{\circ}\text{T} \times \text{min}^{-1}$), während die Frierrate die Menge der Eisbildung pro Zeiteinheit ($\text{g} \times \text{min}^{-1}$)

beschreibt. Die Frierrate kann sowohl mikroskopisch als auch kalorimetrisch ermittelt werden.

Für kryobiologische Fragestellungen ist es wichtig, die Nukleation von Eiskristallen (Kristallisation) kontrollieren zu können. Die Kristallisation einer flüssigen Phase erfordert die Anwesenheit von Kristallisationskernen, an welchen sich die feste Phase ausbildet. Bei reinem Wasser stellen Cluster von Wassermolekülen, die über H-Bindungen verknüpft sind, solche Kerne dar. Diesen Vorgang bezeichnet man als homogene Kristallisation. Zur Bildung eines Kristallisationskernes bedarf es einer bestimmten Kühlrate (Temperaturveränderung pro Zeiteinheit), deren Stärke zur Ausbildung verschieden großer Radien der Eiskristalle führt. Langsame Kühlraten, d. h. eine langsame Reduktion der Temperatur (weniger als 1° C/min), induzieren die Bildung großer Eiskristalle um einige Kristallisationskerne. Hohe Kühlraten hingegen führen zur Bildung vieler kleiner Kristalle, die jedoch thermodynamisch instabil sind und zur Fusion tendieren, um über eine Oberflächenverringerung einen günstigeren energetischen Zustand zu erreichen. Bei ausgesprochen hohen Kühlraten kommt es zu einer Vitrifikation, der Bildung einer amorphen, transparenten, glasähnlichen Eisstruktur, da hierdurch rasch eine Temperatur erreicht wird, die thermodynamisch eine Umwandlung von Wassermolekülen in Kristalle verhindert (Angell, 1982; Cosman, 1989; Franks, 1982; Uhlmann, 1972).

1.6.1.4 Friereigenschaften von Lösungen

Die Lösung von Stoffen, z. B. von Elektrolyten, führt zu einer deutlichen Veränderung der thermischen Eigenschaften der Lösung. Das chemische Potential reiner Flüssigkeiten ist größer als das Potential von Lösungen. Da lebendes Gewebe primär aus Lösungen besteht, ist diese Tatsache aus kryobiologischer Sicht von großer Bedeutung.

Durch gelöste Stoffe wird der „äquilibrierte Frierpunkt“ einer Lösung reduziert. Werden, wie in biologischen Systemen, verschiedene Flüssigkeiten gemischt, so ergibt sich der Dampfdruck des Gemisches entsprechend dem Gesetz von Raoult. Dieses beschreibt den Dampfdruck des Gemisches als Funktion der Dampfdrücke der einzelnen Komponenten und ihrer molaren Fraktionen:

$$P_{\text{tot}} = P_A X_A + P_B X_B$$

P_A und P_B entsprechen dem jeweiligen Dampfdruck der Komponenten A und B, X_A und X_B der jeweiligen molaren Fraktion.

Die gelösten Stoffe vermindern das chemische Potential und den Dampfdruck einer Lösung, indem ihre Moleküle mit den Molekülen des Lösungsmittels im Bereich der Phasentransformation miteinander konkurrieren. Hierdurch wird die Möglichkeit zur Verdampfung des Lösungsmittels reduziert.

Im Rahmen des Friervorganges wird die Kristallisation behindert, da die gelösten Substanzen dem Lösungsmittel den Zugang zu den Kristallisationskernen blockieren. Daraus resultiert eine Erniedrigung des Dampfdruckes, welches sich in einer Verminderung des „äquilibrierten Gefrierpunktes“ zeigt (Abbildung 1).

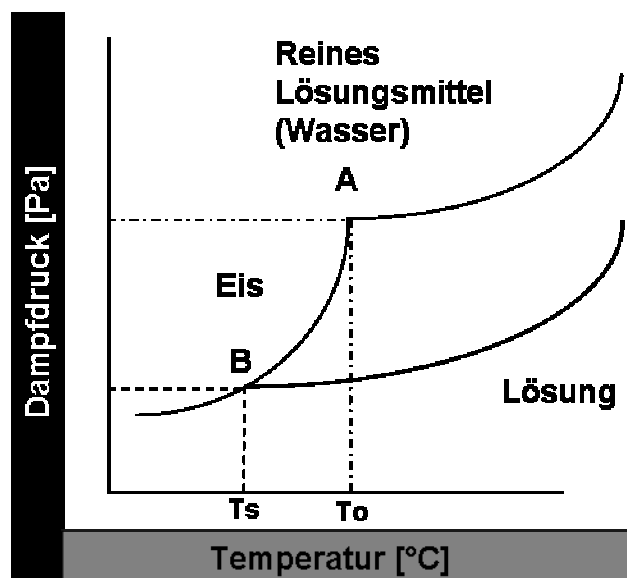


Abbildung 1: Erniedrigung des Dampfdruckes in Lösungen

Mit Abnahme der Temperatur von Wasser sinkt auch sein Dampfdruck. Am „äquilibrierten Gefrierpunkt“ von Wasser (T_0) kommt es zur Eisbildung und die Dampfdruckkurve entspricht der von Eis (AB). Der Dampfdruck der Lösung ist niedriger als der des Lösungsmittels (Wasser) und vermindert sich ebenfalls mit Abnahme der Temperatur. Die Dampfdruckkurve der Lösung schneidet die Dampfdruckkurve von Eis (T_S). An diesem Punkt beginnt die Phasentransformation der Lösung (flüssig \rightarrow fest). Die gelösten Substanzen haben also den Gefrierpunkt um T_0 minus T_S oder ΔT reduziert. Für verdünnte wässrige Lösungen, d. h. bei einer Konzentration gelöster Stoffe von weniger als 0,01 M, ist die molare Gefrierpunktkonstante (K_f) gleich 1,86 – somit ist

$$\Delta T = K_f m,$$

wobei die Variable „m“ hierbei die Molalität (mol/kg) der Lösung repräsentiert. Dieses Verhältnis gilt jedoch nur für stark verdünnte Lösungen. Diesbezüglich verhalten sich 0,01 Mol NaCl gelöst in 1 kg Wasser wie eine 0,02 molare Nicht-Elektrolyt-Lösung mit einer Erniedrigung des Gefrierpunktes um $0,037^{\circ}\text{C}$.

Eine Erniedrigung des Gefrierpunktes bedeutet, dass „Supercooling“ vor der Nukleation stattfindet, wobei jedoch die Temperatur der Lösung nach der Nukleation auf Werte unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser zurückspringen wird. Jedoch kommt es hierbei nicht zur Ausbildung eines Plateaus wie bei reinem Wasser. Vielmehr verzeichnet man einen zunehmenden Temperaturabfall (Abbildung 2 -Abbildung 3). Dies begründet sich in der Tatsache, dass durch die Eisbildung freies Wasser aus der Lösung abgezogen wird und sich somit eine konsekutive Konzentrationserhöhung ergibt (Fahy, 1980, Franks, 1982, Pegg, 1986; Taylor, 1981).

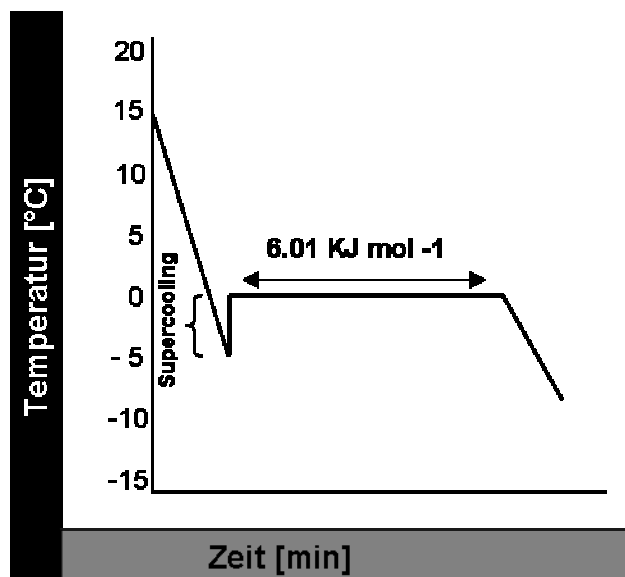


Abbildung 2: Eisbildung in reinem Wasser

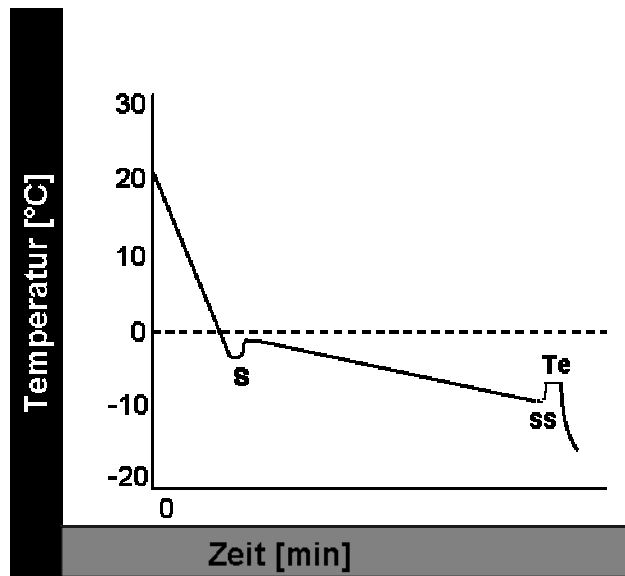


Abbildung 3: Eisbildung in Lösungen

1.6.2 Grundlagen der Kryochirurgie (Gage, 1998; Baust, 1998)

Im Folgenden sollen die Mechanismen der Gewebsschädigung durch kryochirurgische Eingriffe erläutert werden. Die Hauptaspekte der kryochirurgischen Technik beruhen auf drei wesentlichen Punkten: Schnelles Frieren, langsames Tauen und der Wiederholung des Frier-Tau-Zyklus. Die Auswirkungen dieses Verfahrens kann in zwei Gruppen eingeteilt werden: eine unmittelbare und eine verzögerte Reaktion.

1.6.2.1 Unmittelbare Zellschädigung

Mit dem Temperaturabfall im Gewebe kommt es zur Stagnation des Zellmetabolismus. Bei ausreichender Temperatur und Dauer kann es allein durch hypotherme Verhältnisse im Bereich des Nullpunktes in der Zelle zum Zelltod kommen.

Fällt die Temperatur in den Bereich unter 0°C , kristallisiert Wasser. Zuerst kommt es zur Ausbildung von Eis im Extrazellulärraum. Der Entzug von Wasser, d. h. die Verbringung von Wasser aus dem flüssigen in den festen Zustand, führt zu einer hyperosmotischen Umgebung im Extrazellulärraum, die dazu führt, dass Wasser aus der Zelle in den Extrazellulärraum übertritt. Der Prozess schreitet fort durch Ausbildung von Eiskristallen, Zellschrumpfung und Schädigung der Zellmembranen. Nach einiger Zeit wird die Zelle durch einen steigenden Elektrolytüberschuss zerstört.

Die Dehydratation der Zelle geht nicht immer mit Zelltod einher. Eine wesentlich sicherere Methode, den Zelltod herbeizuführen, besteht in der Methode, intrazellulär Eiskristalle zu erzeugen. Die Ausbildung solcher Kristallformationen wird nur bei sehr hohen Kühltemperaturen erreicht. Ab Temperaturen unter -40°C bilden sich intrazellulär Kristalle aus. Diese Kristalle sind in der Lage, Zellorganelle und Membranen zu zerstören und den sicheren Zelltod auszulösen.

Aber nicht nur dem Frierzyklus kommt eine entscheidende Bedeutung durch den Entzug von Wasser zu, sondern auch der Tauzyklus spielt eine wichtige Rolle bei der Zellschädigung. Nach Frieren des Gewebes auf unter -40°C und anschließendem Tauen beginnen sich abermals große Kristalle zu bilden. Besonders im Temperaturbereich von -20°C bis -25°C tritt eine solche Rekristallisation auf.

Taut man das Gewebe weiter auf, tritt Wasser aus dem Extrazellulärraum durch die geschädigten Zellmembranen in den Intrazellulärraum über und schädigt durch den intrazellulären Druckanstieg weitere Membranen.

1.6.2.2 Verzögerte Zellschädigung

Als verzögerte Reaktion werden diejenigen Prozesse gesehen, die nicht unmittelbar mit der direkten, mechanischen Zerstörung des Gewebes einhergehen. Zu diesen Reaktionen gehören in erster Linie der Verlust der Mikrozirkulation der Zelle und die damit verbundene Anoxie.

Ein Gewebe reagiert auf Kühlung mit einer Vasokonstriktion und einem damit verbundenen nachlassenden Blutfluss. Durch das Frieren kommt der Blutfluss zum Stillstand. Beim Tauen setzt die Zirkulation wieder ein, jetzt aber verbunden mit einer Vasodilatation. Durch die entstehende Hyperämie und die dadurch hervorgerufene Permeabilität der Gefäßwände entsteht innerhalb von Minuten ein Ödem, das mehrere Stunden anhält.

Die erhöhte Permeabilität der Gefäßwände kommt durch Schädigung der Endothelzellen durch den Frierzyklus zustande. In folge der Schädigung kommt es nicht nur zu Ödemen, sondern auch zur Thrombozytenaggregation und Ausbildung von Mikrothromben, die die Mikrozirkulation innerhalb von 30-45 Minuten zum Erliegen bringen.

Die meisten Kapillaren sind 4 Stunden nach Tauen komplett durch Mikrothromben verlegt; größere Arteriolen meist erst nach 24 Stunden. Durch diese irreversible Verhinderung der Zirkulation kommt es in Folge zur Nekrose des betroffenen Gewebes.

1.6.3 Die kryochirurgische Technik

1.6.3.1 Die Frierrate

Die Zeit, die man benötigt, um das Gewebe auf die gewünschte Temperatur zu bringen, ist so kurz wie möglich zu wählen, um die höchstmögliche intrazelluläre Eisproduktion zu gewährleisten.

Eine hohe Frierrate erreicht man nur in direkter Umgebung der Kryosonde. Das umliegende Gewebe weist einen wesentlich höheren Zeitindex bis zur vollständigen Frierung auf.

Dementsprechend erscheinen intrazelluläre Eisformationen bevorzugt in direkter Umgebung der Kryosonde, wohingegen in der Peripherie extrazelluläre Eisformationen und geschrumpfte Zellen überwiegen.

Die Frierrate gilt jedoch nicht als das entscheidende Kriterium für die Herbeiführung des Zelltodes, sondern vielmehr wird die Frier-Tau-Rate als das entscheidende Kriterium angesehen.

1.6.3.2 Die Gewebetemperatur

Um ein Gewebe sicher abzutöten, muss die Temperatur so gewählt werden, dass bei allen betroffenen Zellen Zelltod eintritt. Die benötigte Temperatur hängt entscheidend vom Gewebe ab, welches man kryooperativ behandeln möchte. Obwohl der Zelltod aus sehr vielfältigen Gründen eintreten kann, kommt der Gewebetemperatur die entscheidende Bedeutung zu. Die Wahrscheinlichkeit des Zelltods nimmt mit abnehmender Gewebetemperatur zu.

Übereinstimmend ist die Meinung diverser Kryochirurgen, dass ein sicherer Zelltod ab einer Temperatur von unter -50°C bis -60°C zu erreichen ist.

1.6.3.3 Die Frierzeit

Die Frierzeit ist nicht entscheidend für den Erfolg der Knochenkryochirurgie. Sobald man das Gewebe auf unter -60°C kühlt, spielt die einwirkende Zeit keine Rolle mehr. Sie ist lediglich entscheidend für Temperaturen oberhalb -30°C , bei denen die komplette Kristallisation von Wasser nicht stattfindet. Im Zuge von Rekristallisation kann eine verlängerte Frierzeit eine

größere Gewebszerstörung herbeiführen. In der Kryochirurgie an Knochengewebe jedoch ist die Frierzeit unerheblich.

1.6.3.4 Die Taurate

Ein langsames Tauen wird als Hauptaspekt der Zellzerstörung angesehen. Rasches Auftauen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen überleben können. Entscheidende Bedeutung kommt hierbei der Bildung großer Eiskristalle zu, die sich bei langsamer Taurate viel stärker ausbreiten können. Die Eiskristalle sind für die mechanische Zerstörung der Zellen verantwortlich. Die Ausbildung der Kristalle ist am größten im Temperaturbereich zwischen 0° C und -40° C, besonders bei -20° C bis -25° C.

In Experimenten zeigte sich, dass langsames Tauen einen viel größeren Effekt auf die Zellzerstörung hat als schnelles Frieren.

1.6.3.5 Die Wiederholung des Frier-Tau-Zyklus

Dem Frier-Tau-Zyklus kommt entscheidende Bedeutung zu, da Zellen, die wiederholt physikochemischen Temperatureffekten ausgesetzt sind, stärker geschädigt werden. Mit jedem Frier-Tau-Zyklus wird die gewünschte Temperatur im Gewebe schneller erreicht, die Ausbreitung der Frierung im Gewebe wird von Mal zu Mal größer und der Randbezirk der Gewebszerstörung wird bei jedem Zyklus weiter in die Peripherie verschoben. Der Grund für die Ausbreitung der Läsion ist, dass Gewebe, das bereits im ersten Zyklus effektiv zerstört wurde, einen wesentlich geringeren Widerstand darstellt als im zweiten Zyklus.

Bei Temperaturen unter -50° C, bei denen unweigerlich Zelltod eintritt, spielt also die Wiederholung des Zyklus insofern eine Rolle, als ein größeres Gebiet erreicht werden kann (Tab. 3- 4).

Tabelle 3: Faktoren der Zellschädigung

Zyklus	Faktor	Schädigung
Frieren	Intrazelluläre Eisbildung erhöhte Elektrolytkonzentrationen Veränderung des pH-Wertes	Mechanische Schädigung von Zellmembranen Denaturierung der Lipoprotein-Zellmembranen
Tauen	Rekristallisation Übergang in isotones Milieu	Mechanische Schädigung von Zellmembranen Mechanische Schädigung durch Schwellung der Zelle

Nach Kerschbaumer, Kryochirurgische Behandlung von Knochentumoren, 1981

Tabelle 4: Phasen- und Elektrolytveränderungen

Zyklus	Temperatur [°C]	Zelle	Extrazellulärraum
Frieren	0 bis -15	Unterkühlung Gasdruck Flüssigkeitsaustritt, Dehydrierung Elektrolytkonzentration erhöht	Eisbildung Gasdruck Flüssigkeitsaufnahme und weitere Eisbildung (Volumenzunahme)
Frieren	-15 bis -45	Eisbildung	Keine weitere Veränderung
Tauen	-45 bis -15	Rekristallisation (Volumenzunahme)	Rekristallisation
Tauen	-15 bis 0	Weitere Volumenzunahme durch Flüssigkeitseintritt, Elektrolytkonzentration erniedrigt	Flüssigkeitsabgabe, Elektrolytkonzentration erhöht

Nach Kerschbaumer, Kryochirurgische Behandlung von Knochentumoren, 1981

1.6.4 Funktionsweise von Kryogeräten

1.6.4.1 Kühlmittel

Aufgrund ihrer thermodynamischen Eigenschaften werden Kühlflüssigkeiten in 2 Kategorien unterteilt:

- Flüssigkeiten mit einem Siedepunkt unter -150° C (Stickstoff, Sauerstoff)

- Flüssigkeiten mit einem Frierpunkt über -150°C (Kohlendioxid, Freon)

Das am häufigsten angewandte Kühlmittel ist flüssiger Stickstoff. Flüssigstickstoff ist farb- und geruchlos, nicht brennbar, sehr reaktionsträge, hat einen Siedepunkt von -196°C und einen Frierpunkt von -204°C . Im Periodensystem der Elemente steht es unter den Nichtmetallen der 5. Hauptgruppe mit einer Massenzahl von 14,0067.

1.6.4.2 Möglichkeiten der Kälteerzeugung

- Phasenänderung: am effektivsten, da sehr tiefe Temperaturen erreicht werden können. Der flüssige Stickstoff wird durch ein dünnes Rohr zur Sondenspitze transportiert. Dabei wird Wärme absorbiert und der Stickstoff verdampft. Das Gas fließt dann durch ein Außenrohr wieder ab. Zu- und abführender Schlauch sind vakuumisoliert. Temperaturregulierung erfolgt durch Veränderung des Stickstoff-Flows. Mögliche Minimaltemperatur: -196°C
- Joule-Thompson- Effekt: Wenn Gase (z. B. Kohlendioxid) unter Druck durch eine Düse geleitet werden, entsteht infolge der plötzlichen Gasexpansion ein Temperaturabfall. Mögliche Minimaltemperatur: -90°C
- Peltier-Effekt (thermoelektrische Abkühlung): Halbleiter aus Wismuththellurid erzeugen einen Temperaturgradienten unter elektrischer Spannung.
- Adiabatische Gasexpansion mittels Turboexpander: System der Zukunft. Gasexpansion durch Turbinen mit Helium als Kühlmittel. Mögliche Minimaltemperatur: unter minus 196°C ; zur Zeit nur industriell genutzt.

1.6.4.3 Temperaturregistrierung

Die Temperaturregistrierung erfolgt mittels Thermoelementen aus Kupfer-Konstantan oder Eisen-Konstantan, die auf der Basis von Spannungsdifferenzen, welche an der Verbindungsstelle zweier Drähte (Kupfer und Konstantan) bei einer Temperaturdifferenz entstehen (Seebeck-Effekt), eine Messung der Temperatur ermöglichen. Referenzlösung ist Eiswasser. Registrierung erfolgt über Potentiometerschreiber oder Voltmeter.

1.7 Aufbau moderner Kryotherapiegeräte

1.7.1 Basiseinheit

Handelsübliche Kryogeräte arbeiten heute fast alle mit flüssigem Stickstoff als Kühlmittel. Die angebotenen Geräte und deren Funktionsweise richten sich nach der medizinischen Anwendung. So reichen häufig im Bereich der Dermatologie vergleichsweise günstige Geräte aus, die die Kryosonden durch das Prinzip der Schwerkraft versorgen, indem der Dewar-Behälter höher als die Sondenspitze platziert wird. Bei diesem Verfahren wird nur ein geringer Überdruck aufgebaut und tiefe Temperaturen sehr zeitverzögert erzielt.

Im Bereich der Tumorchirurgie werden Kryogeräte eingesetzt, die im Dewar-Behälter einen Druckgradienten aufbauen, der die Sonden aktiv mit Stickstoff versorgt. Der Druckaufbau erfolgt entweder mittels Wärmezufuhr, der den Stickstoff verdampfen lässt oder durch Druckaufbau von außen mittels Zufuhr eines Gases in den Dewar.

Bei beiden Prinzipien besteht der Nachteil darin, dass eine große Menge Stickstoff pro Zeiteinheit „verbraucht“ wird, der dann entweder aus dem System ausgeleitet wird oder in einem zweiten Dewar-Gefäß aufgefangen werden muss. Bei den Kryogeräten der neuen Generation wird mittlerweile der Stickstoff in den gleichen Dewar zurückgeführt.

1.7.2 Aufbau der Kryosonden

Man unterscheidet drei Arten von Kryosonden: elektrische, Hochdrucksonden und Sonden mit Stickstoffkühlung.

Elektrische Kryosonden nutzen den Peltier-Effekt, bei dem zwischen zwei Halbleitern aus Wismuththellurit bei Anlegung einer elektrischen Spannung eine Temperaturdifferenz resultiert. Die Kühlleistung solcher Sonden erreicht maximal -60°C und wird aus diesem Grund fast ausschließlich in der Dermatologie angewendet (Hewitt, 1997). In der Veterinärmedizin können diese Geräte zum Beispiel bei einer Kryoepililation bei Distichiasis eingesetzt werden.

Bei den Hochdruckkryosonden macht man sich den Joule-Thompson-Effekt zu Nutze, bei dem ein hoch komprimiertes Gas mittels einer Düse in die Sonde geführt wird. Durch die Volumenexpansion des Gases in der Sondenspitze wird Energie in Form von Wärme verbraucht und die Umgebungstemperatur sinkt. Die Kühlleistung ist dabei abhängig von Art

und Druck des verwendeten Gases. Verwendet werden häufig Argon, Freon oder Kohlendioxid. Vorteil dieser Technik ist der konstruktionsbedingt kleinere Durchmesser der Sonden im Gegensatz zu Kryosonden. Als Nachteil ist erneut die erreichbare Minimaltemperatur anzusehen (ebenfalls maximal -60°C).

Stickstoffgekühlte Kryosonden entziehen der Umgebung Wärme durch Überschreitung des Siedepunkts des flüssigen Stickstoffs. Ein großer Vorteil hierbei ist die erreichbare Kühltemperatur von bis zu -196°C . Durch neue Techniken wurde Supercooling möglich, bei dem in einem Vakuum Stickstoff unter Druck durch einen Wärmetauscher geleitet wird. Hierbei werden Temperaturen von bis zu -209°C möglich (Baust, 1997).

1.7.3 Aufbau des Erbe-Cryo 6

Das bei den Operationen verwendete Gerät ist ein handelsübliches Kryochirurgiegerät der Firma Erbe™, Tübingen (Abbildung 4).

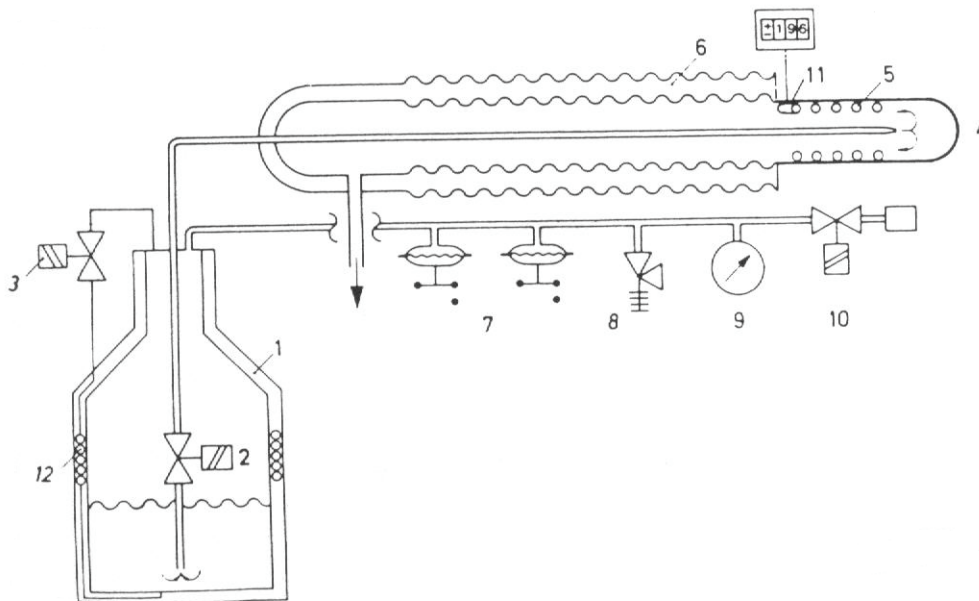


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Erbe Gerätes 1 = Stickstoffbehälter, 2 = Stickstoffventil, 3 = Druckaufbauvorrichtung, 4 = Sondenspitze, 5 = Heizung, 6 = Isolierschlauch, 7 = Druckschalter, 8 = Sicherheitsventil, 9 = Manometer, 10 = Auspuffventil, 11 = Temperaturmeßfühler, 12 = Verdampfungsspirale

Das „Erbokryo CS-6“- System (Erbe, Tübingen) ist ein kommerziell erhältliches Kryotherapiegerät, bestehend aus einem Gehäuse mit Steuereinheit, sowie vakuumisolierten, flexiblen Schläuchen, an deren Enden die Kühltsonden angebracht sind. Der Durchmesser

einer Sonde beträgt 3,2 mm. Im Gehäuse befindet sich ein 47 Liter fassender, ebenfalls vakuumisolierter Tank („Supply Dewar“) mit flüssigem Stickstoff, welcher mittels einer erstmals eingesetzten Tauchpumpe den flüssigen Stickstoff in die Sonden pumpt. Durch dieses Verfahren wird ein Betriebsdruck des Systems von bis zu 15 bar möglich, das die Stickstoffzirkulation durch die angeschlossenen Sonden in Gang setzt. Der Stickstoff erreicht die 3 cm lange Gefrierzone an der Sondenspitze („Freezing Zone“) in flüssiger Form (-196° C) durch eine zentrale Zufuhrleitung und verdampft unter Wärmeabsorption. Mittels einer strömungsoptimierten Wärmetauschung werden unerwünschte Siedeeffekte des Stickstoffs minimiert und so die Kälte extrem schnell und unter hohem Wirkungsgrad an das umliegende Gewebe abgegeben. Die Stickstoffflussrate kann dabei für jede Sonde in vier Stufen zwischen 25 und 100% der Maximalrate (1,5 l/min) gewählt werden. Das Stickstoffgas fließt anschließend durch ein koaxiales Außenrohr wieder in den Tank ab. Insgesamt können 6 Kryosonden simultan verwendet werden.

Das Monitoring der Kryoläsion erfolgt mittels Temperaturmeßfühler, die im Therapiefeld platziert werden. Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um Temperaturfühler aus Nickel/Nickelchrom (Abbildung 5- 8).



Abbildung 5: Kryoeinheit mit integriertem Tank

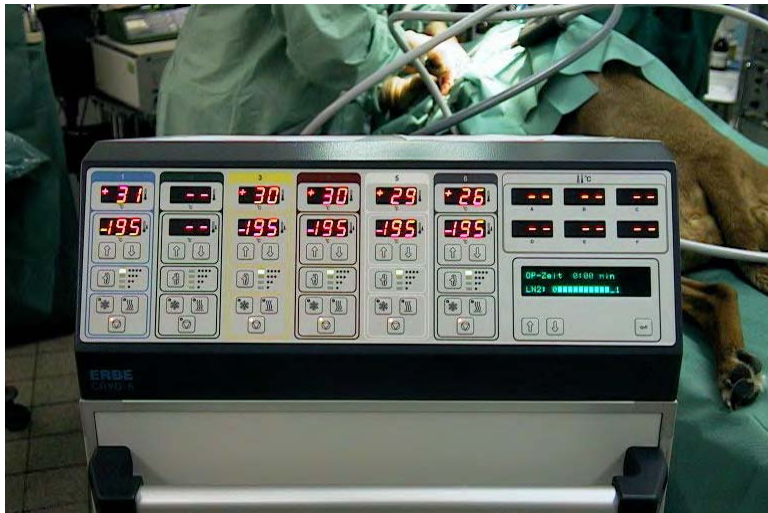


Abbildung 6: Steuerelement



Abbildung 7: Kryosonde

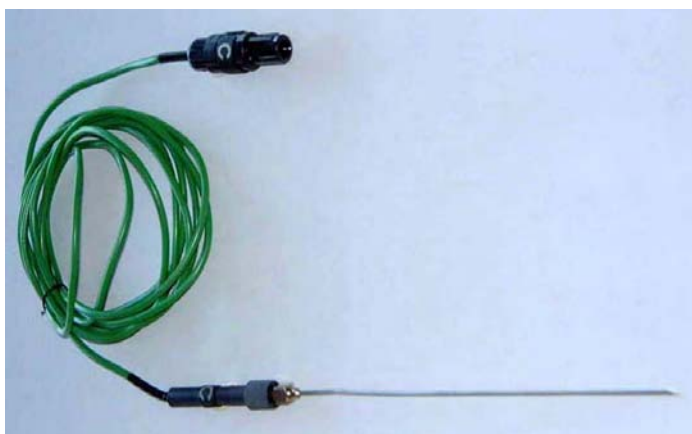


Abbildung 8: Temperaturmessfühler

1.8 Stabilitätsprüfungen

Es gibt nur sehr wenige Veröffentlichungen über Stabilitätsprüfungen an Schafsknochen.

Nafei et al.(2000) publizierten eine Studie an 30 ausgewachsenen Schafen sowie 20 Jungtieren, um das Verhältnis zwischen Alter und mechanischen Eigenschaften am Knochen zu untersuchen. Als Testmaterial dienten Knochenwürfel, die aus dem zu testenden Gebiet ausgestanzt worden waren. Es erfolgte eine Testung auf unterschiedliche biomechanische Belastungen wie Spannung, Elastizität, Energieabsorption bis zum Eintreten der Fraktur und relativer Energieverlust. Die Analyse erfolgte durch eine universelle Materialprüfungsmaschine mittels extensometrischer Messung.

Baumgaertel et al. (1994) veröffentlichten eine Studie über vergleichende osteosynthetische Versorgungstechniken bei Mehrfragmentfrakturen an 36 Schaf-Femora. Bei der biomechanischen Testung wurden die Schaf-Femora nach partieller Einbettung in Acrylat einer exzentrisch axialen Last bis zum Bruch unterzogen. Als Prüfgerät diente das Instron-Gerät.

2 Tiere, Materialien und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und Durchführung

Zur Untersuchung kamen 32 erwachsene Schafe weiblichen Geschlechts der Rassen Merino-Landschaf und Texel mit Körpergewichten zwischen 39 und 76 kg. Die Tiere wurden mittels Halsbändern identifiziert. Eine Woche vor Operationsbeginn wurden die Tiere aufgestellt, hatten freien Zugang zu Wasser und Heu und erhielten zweimal täglich zusätzlich Kraftfutter. 12 Stunden vor OP wurde das Futter entzogen.

Es erfolgte eine Einteilung in 4 Gruppen zu je 8 Tieren:

Gruppe 1: 6-Monats-Gruppe (Überlebenszeit post OP 6 Monate)

Gruppe 2: 4-Monats-Gruppe (Überlebenszeit post OP 4 Monate)

Gruppe 3: 2-Monats-Gruppe (Überlebenszeit post OP 2 Monate)

Gruppe 4: „Akutschafe“ (Überlebenszeit post OP 1 Woche zum Nachweis der Apoptose)

Alle Schafe wurden unmittelbar vor der Operation gewogen.

Als Versuchsknochen wurden das rechte Femur und die linke Tibia definiert; Kontrolle war der jeweils gegenüberliegende Knochen. Die Wahl fiel auf das rechte Femur, weil die Schafe zwangsweise in linker Seitenlage fixiert werden mussten, da ansonsten die Aorta durch das Gewicht des Pansens komprimiert würde. Zur Bohrung der Kontrolle am linken Femur wurden die Tiere nur kurzfristig in die rechte Seitenlage verbracht.

Alle Femora und Tibiae wurden mittels Knochenmarkern markiert und gelangten im weiteren Verlauf zur magnetresonanztomographischen, biomechanischen, röntgenologischen und histologischen Auswertung.

Alle Operationen wurden in einem Operationssaal des Instituts für Experimentelle Medizin der Universität Köln unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Als Prämedikation wurde Propofol (Disoprivan[®], Fresenius) in einer Dosierung von 12 mg/kg intravenös verabreicht.

Alle Tiere wurden anschließend intubiert und beatmet. Als weiterführende Narkose wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran verwendet. Überwachung erfolgte mittels Pulsoxymetrie, Kapnographie und Blutgasanalysen.

Als großlumigen Zugang erhielten die Tiere einen Zentralvenenkatheter, über den im Bedarfsfall Glucose und isotone Kochsalzlösung verabreicht wurde. Zusätzlich wurde bei einigen Tieren ein Swann-Gantz-Katheter via ZVK gelegt.

Präoperativ wurde eine Antibiose mit einem Breitspektrumantibiotikum (Tardomyocel comp.[®], Bayer) in einer Dosierung von 1 ml/10 kg KG vorgenommen und 5 Tage aufrecht erhalten. Als Antiphlogistika wurden Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer) in einer Dosierung von 4 mg/kg KG für 5 Tage und Temgesic[®] 1 Ampulle/Tier post OP eingesetzt.

Je nach postoperativem Zustand wurden die Schafe am 7.-10. Tag post OP entlassen und erhielten Weidegang bis zum Schlachttermin.

Eine Kontrolle der Tiere auf ihren Gesundheitszustand erfolgte in regelmäßigen Abständen auf dem Hof des betreuenden Landwirts.

2.2 Operationsdurchführung

2.2.1 Femur

Nach Rasur des lateralen Oberschenkel- und Kniebereichs und dessen Desinfektion begann der Hautschnitt im oberen Drittel des Femurschafts in gerader Führung bis auf den Condylus lateralis femoris. Subkutanes Fettgewebe und oberflächliche Faszie wurden im Verlauf des Hautschnittes durchtrennt.

Nach Retraktion der Hautränder wurde die Fascia lata durchtrennt und im kaudolateralen Bereich zwischen Musculus vastus lateralis und Musculus glutaebiceps stumpf präpariert.

Im der darunter liegenden Ebene wurde mittels Hohmann-Hebeln der Musculus vastus lateralis nach kranial, der Musculus adductor nach kaudal verlagert.

Nach Ligatur der Arteria und Vena caudalis femoris distalis wurde im Bereich 3 cm über dem kaudalen Bereich des Condylus lateralis femoris im Bereich der Fovea poplitea monokortikal ein Bohrloch mit 4 mm Durchmesser gebohrt. Nach Vermessung der Bohrlochtiefe wurde die Kryosonde im Bohrloch so platziert, dass das Ende auf der Gegenkortikalis auflag.

Nach Einbringen von Temperatursonden im umliegenden Weichteil- und Knochengewebe und nach großzügiger Befreiung von Muskelanteilen am Knochen mittels Rasparatorium wurden 2 Frierzyklen gestartet.

Frierzyklus: 9-minütiges Frieren mit anschließendem aktivem Tauvorgang; danach erneutes 9-minütiges Frieren mit anschließendem passivem Tauvorgang. Beim aktiven Tauvorgang wird die Sonde nach Frierung auf Raumtemperatur erwärmt, wogegen beim passiven Tauen die Sonde durch die Umgebungstemperatur passiv erwärmt wird.

Nach beiden Zyklen wird das kryochirurgisch behandelte Gewebe mittels isotoner Kochsalzlösung gespült.

Es wurde lediglich eine fortlaufende Naht der Fascia lata mit 2/0 PDS-Faden gelegt und anschließend eine subkutane fortlaufende Naht mit Vicryl 2/0. Hautnaht erfolgte mit Einzelheften mit 2/0 Seidenfaden.

2.2.2 *Tibia*

Um die mediale linke Tibia zu erreichen, wurde die rechte Hintergliedmaße in linker Seitenlage abduziert und fixiert.

Nach Rasur und Desinfektion des medialen Kniebereichs wurde der Gelenkspalt mit einer sterilen Kanüle gekennzeichnet. Etwa 2 cm unterhalb des Gelenkspalts wurde ein 1,5-2 cm langer Schnitt geführt, der bis unmittelbar auf den Knochen reichte. Nach Bohren des ebenfalls monokortikalen Bohrloches mit Durchmesser 4 cm unter Verwendung der Gewebeschtzhülse und Vermessung der Bohrtiefe wurde die Kryosonde bis zur Gegenkortikalis vorgeschoben.

Es erfolgten ebenfalls 2 Frierzyklen, vergleichbar mit denen des Femur, mit Ausnahme der Frierzeit. Bei der Tibia wurde eine Frierzeit pro Zyklus von 15 Minuten festgesetzt.

Verschluss erfolgte nach Spülung der betroffenen Stelle mit isotoner Kochsalzlösung mit 2/0 Seide.

2.3 Magnetresonanztomographie

Sofort im Anschluss an die OP wurden die Tiere mittels tragbarem Beatmungsgerät unter Aufrechterhaltung der Narkose mit Propofol nach Bedarf und Überwachung mittels

Pulsoxymetrie per Transportwagen in das Institut für Kernspintomographie der Universität Köln gebracht. Vor Durchführung der Kernspintomographie wurden die Tiere an ein stationäres Narkosegerät mit Halothanverdampfer angeschlossen. Die Überwachung der Tiere im Kernspintomographen konnte nur durch einen Tierarzt erfolgen, da alle Überwachungsgeräte magnetisch waren und deshalb nicht zum Einsatz kommen durften.

Tiere der Gruppen 1-3 wurden mit einer Ausnahme unmittelbar post OP und vor der Schlachtung mittels Kernspintomographie untersucht.

Tibia und Femur beiderseits wurden mit und ohne Kontrastmittelanreicherung dargestellt und ausgewertet.

2.4 Röntgendiagnostik

Beide Tibiae und Femora aller Gruppen wurden unmittelbar nach Schlachtung entnommen und von Weichteilgewebe befreit. Sofort nach der Präparation wurden die Knochen gekennzeichnet und zur Konservierung tiefgefroren.

Zur Röntgendiagnostik wurden Aufnahmen mit fein-zeichnenden Folien in 2 Ebenen belichtet: 1. Ebene laterolateraler Strahlengang, 2. Ebene ap.

Die Auswertung der Röntgen- und magnetresonanztomographischen Befunde ist Bestandteil einer anderen Arbeit und wird hier nicht näher erläutert.

2.5 Testung der biomechanischen Belastbarkeit

Die Tests auf biomechanische Belastbarkeit wurden im Institut für Biomechanik der Sporthochschule Köln durchgeführt.

Sowohl Kontroll- als auch Versuchsknochen wurden pro Tier getestet und ausgewertet. Auf das Femur wurde ein Biegemoment im Bereich des kryochirurgisch behandelten Gebietes bzw. entsprechender Kontrollstelle bis zu dessen Frakturierung ausgeübt und gemessen.

Auf den medialen Tibiakopf wurde eine Kraft bis zur Impressionsfraktur ausgeübt und gemessen.

2.6 Histologie

2.6.1 Knochenmarker

Zur histologischen Auswertung der Ab- und Umbauprozesse am Knochengewebe und deren zeitlichen Einordnung wurden Knochenmarker verwendet, die sich in das Knochengewebe einlagern. Aus jedem Knochen wurde Proben aus dem behandelten Gebiet zur histologischen Auswertung genommen.

Die Markierung erfolgte durch vier verschiedene Marker:

1. Calceingrün (Fluorexon)
2. Xylenolorange
3. Alizarinkomplexon
4. Tetrazyklin

Aus Kostengründen konnten nicht alle Tiere mit Xylenolorange und Alizarinkomplexon behandelt werden; daher wurden 3 Tiere pro Gruppe unter randomisierten Bedingungen ausgewählt, die zusätzlich zu Calceingrün und Tetrazyklin diese Marker erhielten. An deren Stelle wurde bei allen anderen Tieren im Wechsel Calcein und Tetrazyklin verwendet.

Die Verabreichung erfolgte subkutan nach Lösung in 2%-iger Bikarbonatlösung (Calceingrün und Alizarinkomplexon) bzw. sterilem Wasser (Xylenolorange) und Verwendung eines handelsüblichen Tetrazyklins pro inj. nach folgendem Schema (Tabelle 5, Markernummer entspricht denen der obigen Ausführung):

Die Farbmarker wurden den Tieren in festgelegten Zeitabständen verabreicht.

Tabelle 5: Knochenmarkierung.

10 Tage post OP und 15 Tage post OP	Marker 1
28 Tage post OP und 33 Tage post OP	Marker 2
6 Wochen post OP	Marker 3 (nur 3 Tiere pro Gruppe)
6 Wochen post OP	Marker 1
8 Wochen post OP Gruppe 1 fertig, d. h. 8 Tiere tot	
8 Wochen post OP	Marker 4 (nur 3 Tiere pro Gruppe)

8 Wochen post OP	Marker 2
10 Wochen post OP	Marker 1
13 Wochen post OP	Marker 2
16 Wochen post OP Gruppe 2 fertig, d. h. 16 Tiere tot	
16 Wochen post OP	Marker 3 (nur 3 Tiere)
16 Wochen post OP	Marker 1
20 Wochen post OP	Marker 4 (nur 3 Tiere)
20 Wochen post OP	Marker 2

Alle Injektionen wurden von allen Tieren gut vertragen; es traten weder Reaktionen an der Injektionsstelle auf noch wurden systemische Nebenwirkungen beobachtet.

Nach Tötung der Tiere und Extraktion von Tibiae und Femora wurde zuerst die Prüfung der biomechanischen Belastbarkeit der Knochen durchgeführt. Unmittelbar nach dem Test wurde aus der Probenlokalisierung Gewebsstücke (Knochenzylinder) entnommen, gekennzeichnet und in Schaffers Reagenz fixiert.

Schaffers Reagenz ist ein Ethanol-Formaliningemisch im Verhältnis 2:1 und verhindert – anders als bei anderen Fixierungsmedien – das Herauslösen der Fluorochrome aus dem Knochengewebe.

Da auch bei einer Entkalkung des Knochengewebes zur Vorbereitung auf die histologischen Schnitte mittels EDTA die Knochenmarker in Lösung gehen, musste die Histologie am Nativpräparat durchgeführt werden. Hierzu wurde die Trenn-Dünnschliff-Technik verwendet.

Folgend wird das Verfahren zur Herstellung von Dünnschliffpräparaten dargestellt (Abbildung 9).

2.6.2 Trenn-Dünnschliff-Technik (Sandwich-Technik) nach Donath und Breuner (1989).

Die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath und Breuner wurde zur histologischen Untersuchung nicht schneidbarer Materialien entwickelt. Mit dieser Methode können Dünnschliffe von unter 10 µm Dicke von Präparaten erzeugt werden, die mittels herkömmlicher Mikrotom-Schnitttechnik nicht hergestellt werden können. Als Präparate

eignen sich zum Beispiel zahntragende Kieferabschnitte, Knochengewebe mit oder ohne Implantat oder ähnlich harte Substanzen.

Zur Herstellung eines Dünnschliffes wurden folgende Materialien verwendet:

Geräte:

- EXAKT-Trennschleifsystem
- EXAKT-Mikro-Schleifsystem

Hilfsgeräte:

- EXAKT-Vakuum-Klebevorrichtung zur planparallelen Aufblockung
- EXAKT-Präzisionsklebepresse für Objektträgermontage
- Kulzer-EXAKT-Lichtpolymerisationsgerät
- Mikrometerschraube
- Fühllehre 0,05 bis 0,50 mm
- Haarlineal

Verbrauchsmaterialien:

- Einbettmedium (Technovit 7.200 VLC, Kulzer)
- Technovit 4000, Kulzer
- Präzisionskleber lichthärtend Technovit 7.210 VLC, Kulzer
- Fixationskleber (Technovit 7.230 VLC, Kulzer)
- Lichtdurchlässige Einbettmulden
- Plexiglas- Objektträger
- Schleifpapier in verschiedenen Körnungen

Sonstiges:

- Glykolmethacrylat
- Eindeckmittel und Deckgläser
- Aceton oder Petroleumbenzin

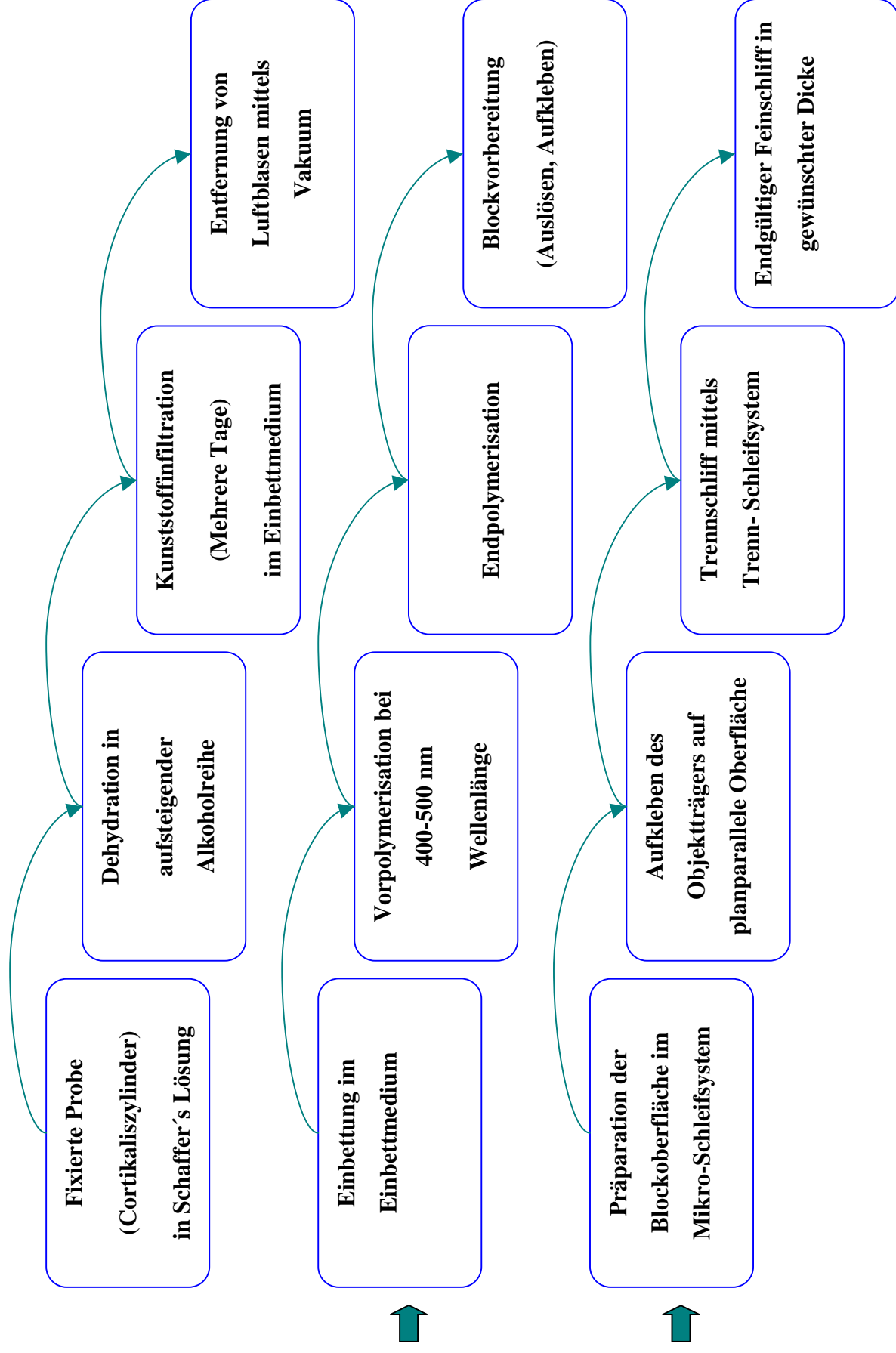


Abbildung 9: Ablauf der Trenn-Dünnschliff-Technik

Nach Gewinnung der Proben wurden diese sofort in ein Fixierungsmedium gegeben.

Die Entwässerung der Proben erfolgte manuell in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem üblichen Verfahren. Nach Dehydratation wurden die Proben in den flüssigen Einbettkunststoff verbracht. Zur Infiltration des Kunststoffes in das Gewebe wurden die Präparate einige Tage unter Ausschluss von Licht (da der Kunststoff lichthärtend ist) durchtränkt. Um letzte Lufteinschlüsse zu beseitigen, wurde kurz vor Einbettung eine Luftextraktion im Vakuum durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in Einbettmulden gegeben und mit flüssigem Kunststoff aufgefüllt. Dabei wurden die Präparate entsprechende der geplanten Schnittrichtung orientiert. Danach erfolgte die Polymerisation des Kunststoffes in 2 Schritten: Um Spannungsrisse im Kunststoffblock zu vermeiden, wurde die langsame Polymerisation unter großem Lampenabstand bei einer Wellenlänge von 400- 500 nm für etwa 1 Stunde eingeleitet; die Endpolymerisation erfolgt dann bei gleicher Wellenlänge und Polymerisationstemperatur $>40^{\circ}\text{C}$ für weitere 6 Stunden.

Nach Herauslösen der Blöcke aus den Einbettmulden liegt der schneid- und schlifffähige Einzelblock des Präparates vor (Abbildung 10).

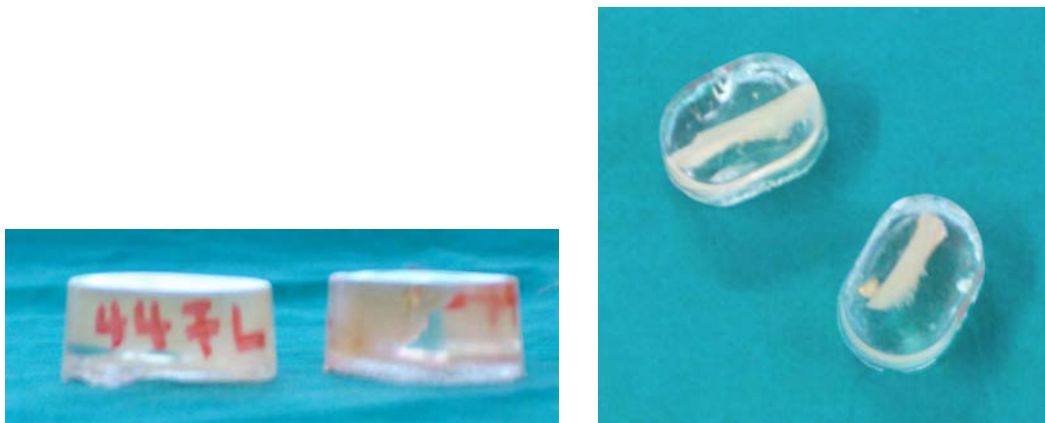


Abbildung 10: Ausgelöste Blockeinbettungen in Profilansicht und Aufsicht

Der Block wurde zur weiteren Bearbeitung auf der Gegenseite der zu untersuchenden Fläche mittels der Vakuum-Klebpresse mit Technovit auf einen Objektträger aufgeklebt. Der auf dem Objektträger montierte Kunststoffblock wurde nun im Mikroschleifsystem arretiert und bei grober Körnung bis auf die gewünschte Präparatoberfläche abgeschliffen. Die gewünschte Oberfläche wurde dann mit einem feinkörnigen Schleifpapier nachbehandelt, um eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten. Eventuelle Unebenheiten werden mit einem

Haarlineal kontrolliert. Die Dicke von Objektträger und Block wurde mit einer Mikrometerschraube gemessen.

Ein weiterer Objektträger wurde vor Aufbringen auf die zu untersuchende Schnittfläche mittels Mikrometerschraube auf Planparallelität geprüft und die Dicke notiert. Nach Reinigung von Objektträger und Schnittoberfläche mit Aceton wurde die Schnittoberfläche mit dem Präzisionskleber versehen und auf den Objektträger in der Vakuum-Klebepresse bei konstantem Druck aufgeklebt. War das Klebeergebnis zufriedenstellend (keine Blasenbildung), wurde der Kleber durch Belichtung für 10 Minuten ausgehärtet. Nach Ausmessung der Dicke des Gesamtblockes incl. Objektträgern ergibt sich rechnerisch die Dicke der Klebefläche.

Nun wurde der präparierte Block (Sandwich) in dem Trenn-Schleifsystem arretiert und das Präparat bei einer Vorschubkraft von 50-100 Pond mit einem mit Bornid- oder Diamantkörnern beschichteten Stahlband auf die voreingestellte Dicke geschnitten.

Die Dicke des Präparates wurde mit einer Mikrometerschraube gemessen. Nach Arretierung des Schnittes im Mikro-Schleifsystem und Ermittlung des Nullpunktes wurde das Präparat zuerst bei grober Körnung, später bis zum Erreichen der gewünschten Dicke mit feineren Schleifpapieren geschliffen. Zur Erhaltung der Fluoreszenz sollten Präparatedicken von 60 µm nicht unterschritten werden.

2.7 Stabilitätsprüfung

Im Vorfeld der Stabilitätsprüfung musste überlegt werden, wie ein Modell verwirklicht werden kann, in dem sowohl die Durchführbarkeit gewährleistet ist als auch entsprechende biologische Belastungsmuster im Versuch imitiert werden können. Aus Gründen der Übertragbarkeit auf biomechanische Verhältnisse im Skelettsystem kam nur eine Versuchsanordnung in Frage, bei der die gesamte behandelte Fläche und das unbehandelte umliegende Gewebe mit einbezogen werden können.

In Zusammenarbeit mit Sportmedizinern und Experten auf dem Gebiet der Biomechanik konnte ein durchführbares Modell für Belastungen des kompletten Knochens entwickelt werden. Nachgeahmt wurden typische Belastungsmuster, die die realen Kräfte, die auf Knochen einwirken können, simulieren.

Wir entschieden uns, im Bereich des Femur als Kraft ein Biegemoment einwirken zu lassen; bei den Tibiae sollte eine Kompressionskraft im Bereich des medialen Condylus einwirken.

Gegeneinander verglichen wurden Kontrollseite und Versuchseite, um eine Aussagekraft pro Tier und Gruppe treffen zu können. Diese Methode erschien uns am besten geeignet zu sein, da aufgrund von Inhomogenitäten in der Versuchstiergruppe durch unterschiedliches Gewicht der einzelnen Tiere und daraus resultierender unterschiedlicher Knochendicke ein direkter Vergleich innerhalb der Gruppen nicht repräsentativ gewesen wäre.

2.7.1 Versuchsaufbau

2.7.1.1 Mechanische Prüfung der Femora

Die Biegetests der Femora wurden mit der Materialprüfmaschine Z 2.5/ TN 1S der Firma Zwick GmbH & Co, Ulm, mit einer Prüfkraft von 8-2.500 N bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Prüfmaschine enthielt eine elektronische Mess- und Regeleinheit. Das Femur wurde mit der distalen Epiphyse im Abstand von 2 mm zum Bohrloch in einen Metallzylinder mit den Abmessungen 10 x 10 x 8 cm mit einem Eingussbereich von 7 cm Durchmesser mit PMMA (Technovit 4004, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim) eingegossen. Für den Biegeversuch wurde die Probe horizontal gelagert, so dass das Bohrloch nach oben zeigte. Der Knochen wurde mit einem konkaven Stempel (0,5 x 2 cm) im Abstand von $9,2 \pm 0,8$ cm zur Kante des Metallzylinders belastet (Abbildung 11). Nach Aufbringen einer Vorkraft von 1 N mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min wurde der Femurknochen bei 1 mm/sec bis zum Bruch belastet. Es wurde ein 2,5 kN Kraftsensor benutzt. Gemessen wurden die absolute maximale Bruchfestigkeit, die maximale Biegefestigkeit und die maximale Biegefestigkeit relativiert auf das Körpergewicht.

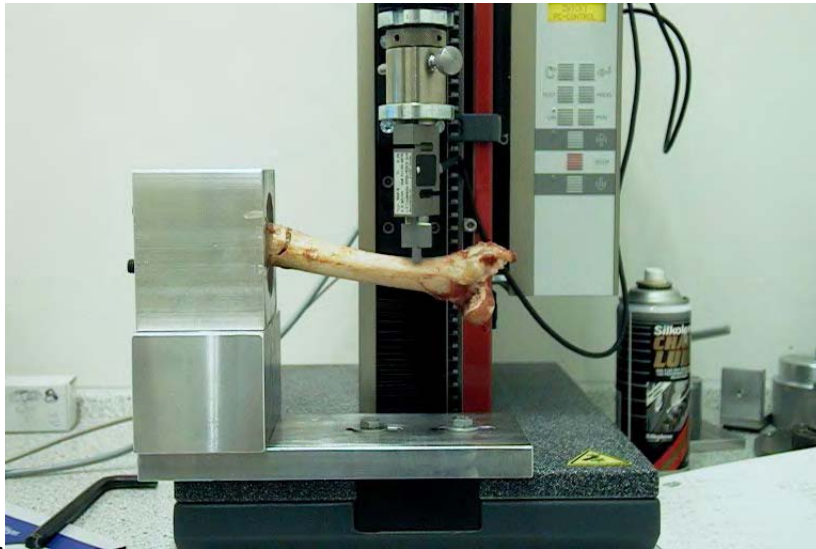


Abbildung 11: Prüfmaschine mit eingespanntem Präparat

2.7.1.2 Mechanische Prüfung der Tibiae

An der Tibia wurde für die Materialtests die distale Epiphyse entfernt. Die Knochendiaphyse wurde mit PMMA in einen Metallzylinder mit den Abmessungen 6 x 6 x 7 cm mit einem Eingussbereich von 3,5 cm eingegossen. Die Materialtests wurden mit einer selbstkonstruierten Testmaschine durchgeführt. Vortests hatten ergeben, dass keine Materialprüfmaschine zur Verfügung stand, die die Kraft zur Impressionsfraktur des Tibiacondylus aufbringen konnte.

An einer Handpresse mit Zahnstange wurde ein 20 kN Quarzkristallsensor, 1-D, Piezo der Firma Kistler Instrumente GmbH, Winterthur, zur Kraftmessung eingebaut. Die Verformung wurde mit einem induktiven Wegaufnehmer gemessen. Zur Überwachung und Aufzeichnung der analogen Daten des Kraft- und Längensensors wurde das Gerät Digiforce 9306 der Firma Burster Präzisionsmesstechnik, Gernsbach, verwendet. Die Messfrequenz betrug 500 Hz. Anschließend wurden die Daten computertechnisch erfasst und zur Auswertung geglättet.

Die Probe wurde vertikal auf Kompression mit einem abgerundeten Stempel mit einem Durchmesser von 15 mm bei einer Fläche von 209 mm² belastet (Abbildung 12). Die Kraft wurde am Tuberculum intercondylare mediale manuell mit etwa 1 mm/sec bis zum Bruch eingeleitet.

Es wurde die absolute maximale Kompressionsfestigkeit relativiert auf das Körpergewicht und die maximale Spannung, d. h. die maximale Kompressionsfestigkeit geteilt durch die Fläche des Stempels, ermittelt.

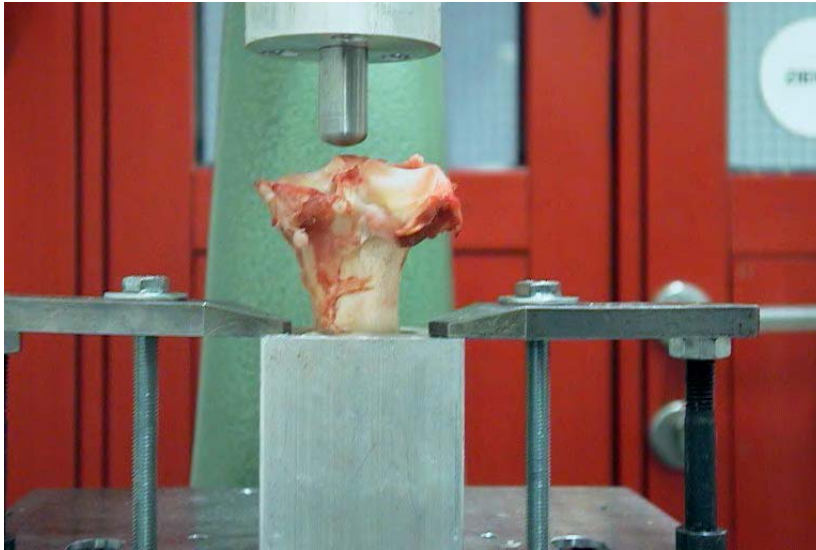


Abbildung 12: Testung der distalen Tibia

2.7.2 Statistik

Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) erfolgte im Rahmen einer deskriptiven Analyse mit dem Wilcoxon-Test. Als Statistikprogramm diente SPSS Version 9.0 für Windows.

3 Ergebnisse

Alle operierten Tiere überstanden die Operation ohne größere Komplikationen. Ein Schaf verstarb kurz nach Narkoseeinleitung ohne ersichtlichen Grund an Herz-Kreislauf-Stillstand und wurde nicht in die Studie einbezogen.

Eine oberflächliche Wundinfektion im Bereich des rechten Femur mit Nekrose von Hautanteilen um die Naht trat bei einem Tier auf. Die sekundäre Wundheilung erfolgte ohne Komplikationen.

Alle Tiere belasteten bereits 2 Tage post OP alle Gliedmaßen ohne Anzeichen einer Lahmheit.

Zwei Tiere waren ohne unser Wissen zum Zeitpunkt der Operation tragend und abortierten am Tag nach der OP.

Während der Operation war die häufigste Komplikation das Frieren von Weichteilgewebe, welches nicht ausreichend geschützt war. Besonders die Heilung der Muskulatur, der Gefäße und des Bindegewebes verlief spontan und ohne Anzeichen von negativen Auswirkungen auf das Tier.

Im Bereich der Tibia wurde fast immer die umliegende Haut in Mitleidenschaft gezogen, eine Heilung erfolgte spontan und ohne Infektionen.

Im Kernspintomograph wurde ein Schaf versehentlich extubiert und musste daraufhin erneut intubiert werden.

Ein Tier regurgitierte Panseninhalt bei der Prämedikation zur zweiten Kernspintomographie kurz vor der Schlachtung, was eine Intubation unmöglich machte. Das Schaf wurde aus Tierschutzgründen notgetötet und war damit für die Kernspinkontrolle verloren.

Die Verabreichung der Farbmarker verlief ohne Abszessbildungen an der Einstichstelle. Die Marker wurden von allen Tieren gut vertragen.

Insgesamt war die Komplikations- und Infektionsrate trotz einiger ungewollter Frierungen von Weichteilgewebe gering. Alle Tiere erholten sich gut von der bis zu 6-stündigen Narkosedauer und liefen nach spätestens 2 Tagen ohne Lahmheitserscheinungen. Auch im weiteren Verlauf waren keine Verluste durch Spätschäden oder Spontanfrakturen zu verzeichnen.

3.1 Stabilitätsprüfung

Tabelle 6: Auswertung Femur 2-Monats-Gruppe

Lateralität	Kontrollgruppe												Versuchsgruppe											
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Schaf-Nr.	39	46	53	54	57	62	65	67	MW				39	46	53	54	57	62	65	67	MW			
Hebelarm	0,097	0,100	0,087	0,095	0,097	0,100	0,085	0,085					0,090	0,100	0,067	0,087	0,090	0,097	0,087	0,085				
Körpergewicht	55	57	65	69	60	39	69	55	58,63				55	57	65	69	60	39	69	55	58,63			
Max. Stempelkraft [N]	1270	1277	1440	1294	989	497	1288	798	1107				685	1059	1396	1036	930	569	1277	1364	1040			
Max. Biegemoment [Nm]	123	128	125	123	96	50	109	68	103				62	106	94	90	84	55	111	116	90			
Max. Biegemoment / Körpergewicht [Nm/kg]	2,2	2,2	1,9	1,8	1,6	1,3	1,6	1,2	1,7				1,1	1,9	1,4	1,3	1,4	1,4	1,6	2,1	1,5			

Tabelle 7: Auswertung Femur 4-Monats-Gruppe

Lateralität	Kontrollgruppe														Versuchsgruppe													
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Schaf-Nr.	40	48	50	52	59	64	68	69	MW						40	48	50	52	59	64	68	69	MW					
Hebelarm	0,097	0,100	0,097	0,085	0,087	0,085	0,100	0,095							0,097	0,100	0,097	0,085	0,087	0,095	0,100	0,105						
Körpergewicht	64	48	62	48	64	78	67	70	63						64	48	62	48	64	78	67	70	63					
Max. Stempelkraft [N]	1035	841	749	945	1554	1276	1145	1475	1127						1132	872	793	940	1555	1151	1033	1411	1111					
Max. Biegemoment [Nm]	100	84	73	80	135	108	115	140	104						110	87	77	80	135	109	103	148	106					
Max. Biegemoment / Körpergewicht [Nm/kg]	1,6	1,8	1,2	1,7	2,1	1,4	1,7	2,0	1,7						1,7	1,8	1,2	1,7	2,1	1,4	1,5	2,1	2					

Tabelle 8: Auswertung Femur 6-Monats-Gruppe

	Kontrollgruppe												Versuchsgruppe													
Lateralität	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Schaf-Nr.	42	43	44	45	47	51	56	58	MW				42	43	44	45	47	51	56	58	MW					
Hebelarm	0,085	0,100	0,090	0,100	0,093	0,085	0,097	0,100					0,087	0,100	0,087	0,085	0,089	0,077	0,097	0,100						
Körpergewicht	76	67	57	50	54	62	57	60	60				76	67	57	50	54	62	57	60	60					
Max. Stempelkraft [N]	1429	1018	1110	928	1223	1127	985	1084	1113				1173	955	1191	1142	1055	968	948	827	1033					
Max. Biegemoment [Nm]	122	102	100	93	114	96	96	108	104				102	95	104	97	94	75	92	83	93					
Max. Biegemoment / Körpergewicht [Nm/kg]	1,6	1,5	1,8	1,9	2,1	1,5	1,7	1,8	1,7				1,3	1,4	1,8	1,9	1,7	1,2	1,6	1,4	1,6					

Tabelle 9: Auswertung Tibia 2-Monats-Gruppe

	Versuchsgruppe												Kontrollgruppe											
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Lateralität	39	46	53	54	57	62	65	67	MW				39	46	53	54	57	62	65	67	MW			
Schaf-Nr.	55	57	65	69	60	39	69	55	59				55	57	65	69	60	39	69	55	59			
Körpergewicht	7112	5980	6060	6076	7192	7607	9281	9154	7308				6395	6299	4417	4417	6873	6618	6841	7256	6140			
Max. Stempelkraft [N]																								
Max. Stempelkraft/Körpergewicht [N/kg]	129	105	93	88	120	195	135	166	129				116,27	110,51	67,95	64,01	114,55	169,69	99,14	131,93	109			

Tabelle 10: Auswertung Tibia 4-Monats-Gruppe

	Versuchsgruppe												Kontrollgruppe											
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Lateralität																								
Schaf-Nr.	40	48	50	52	59	64	68	69	MW				40	48	50	52	59	64	68	69	MW			
Körpergewicht [kg]	64	48	62	48	64	78	67	70	63				64	48	62	48	64	78	67	70	63			
Max. Stempelkraft [N]	11051	8659	11227	9313	6203	6060	7240	7862	8452				7352	8005	8643	9473	6044	6251	10079	8340	8023			
Max. Stempelkraft / Körpergewicht [N/kg]	173	180	181	194	97	78	108	112	140				114,88	166,77	139,40	197,35	94,44	80,14	150,43	119,14	133			

Tabelle 11: Auswertung Tibia 6-Monats-Gruppe

	Versuchsgruppe														Kontrollgruppe													
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Lateralität	42	43	44	45	47	51	56	58	MW	42	43	44	45	47	51	56	58	MW										
Schaf-Nr.	76	67	57	50	54	62	57	60	60	76	67	57	50	54	62	57	60	60										
Körpergewicht [kg]	8643	5996	4800	5263	6076	6012	9058	9823	6959	5007	6219	7511	6554	8579	6156	7320	6156	6688										
Max. Stempelkraft [N]	114	89	84	105	113	97	159	164	116	66	93	132	131	159	99	128	103	114										
Max. Stempelkraft/Körpergewicht [N/kg]																												

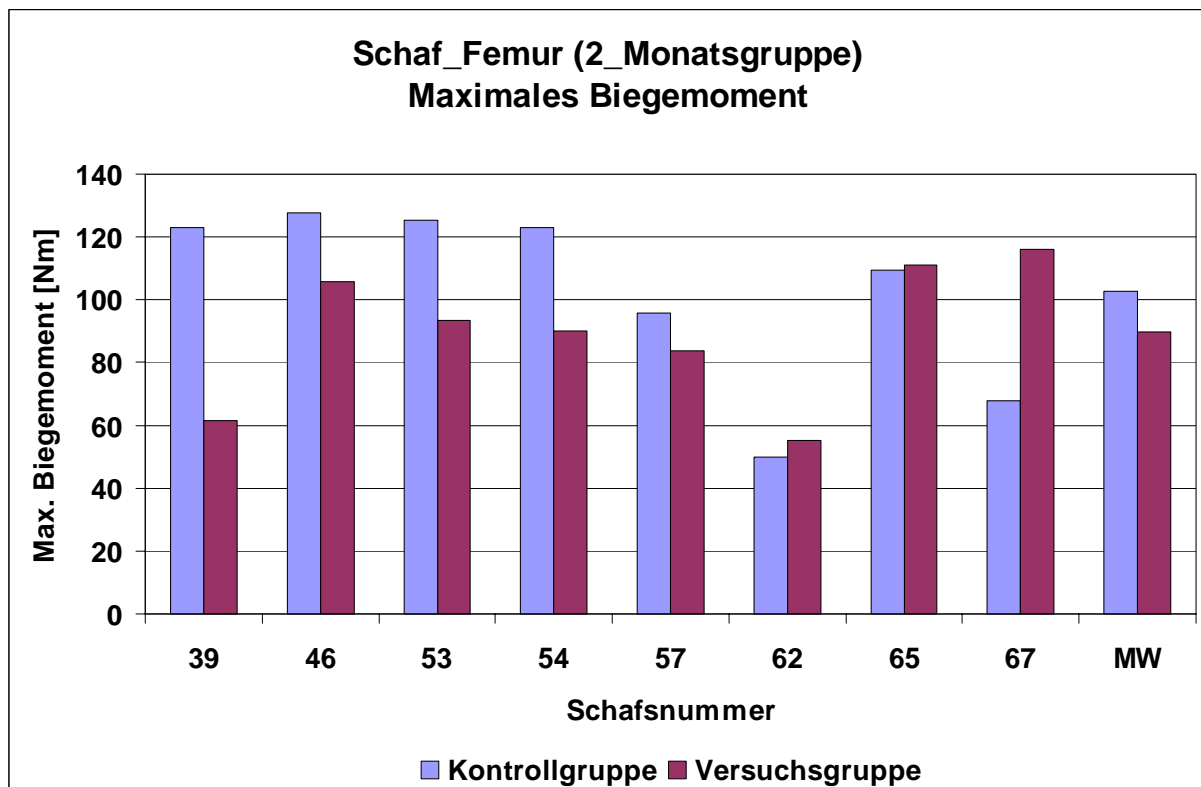


Abbildung 13: Maximales Biegemoment. Schaf – Femur – 2-Monatsgruppe

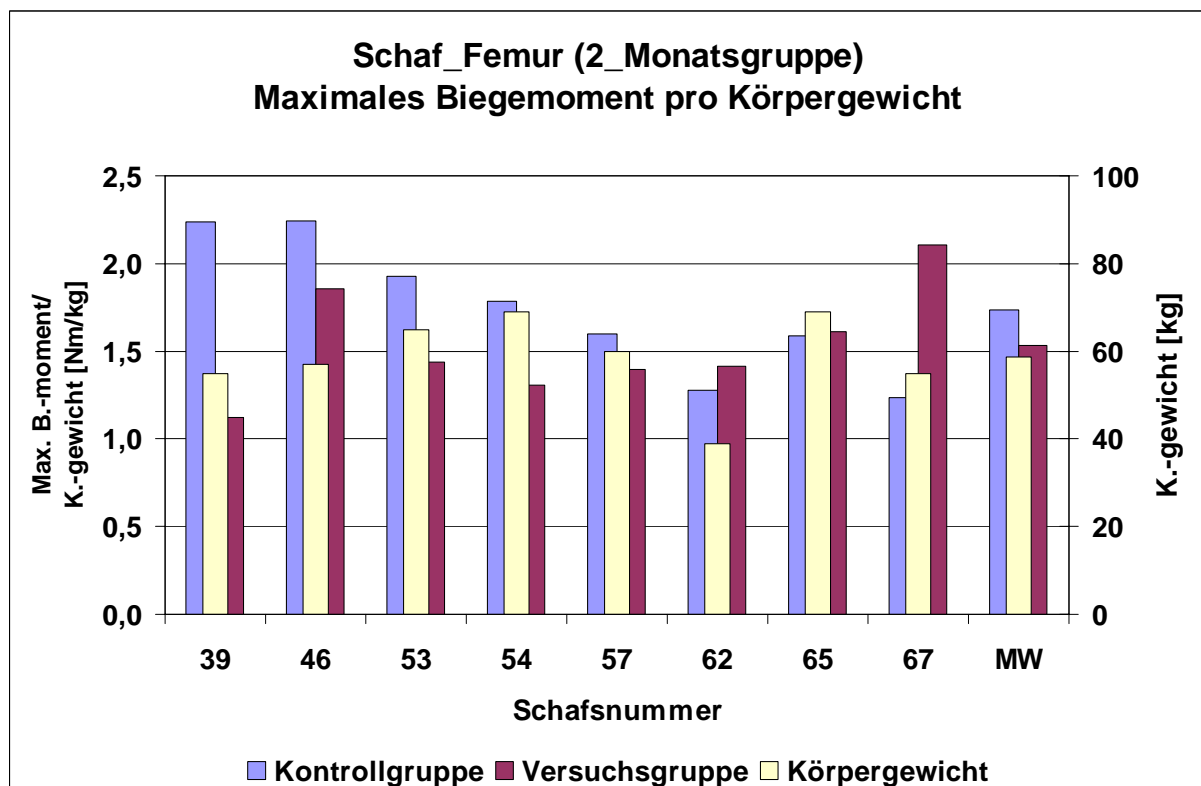


Abbildung 14: Maximales Biegemoment bezogen auf Körpergewicht. Schaf – Femur – 2-Monatsgruppe

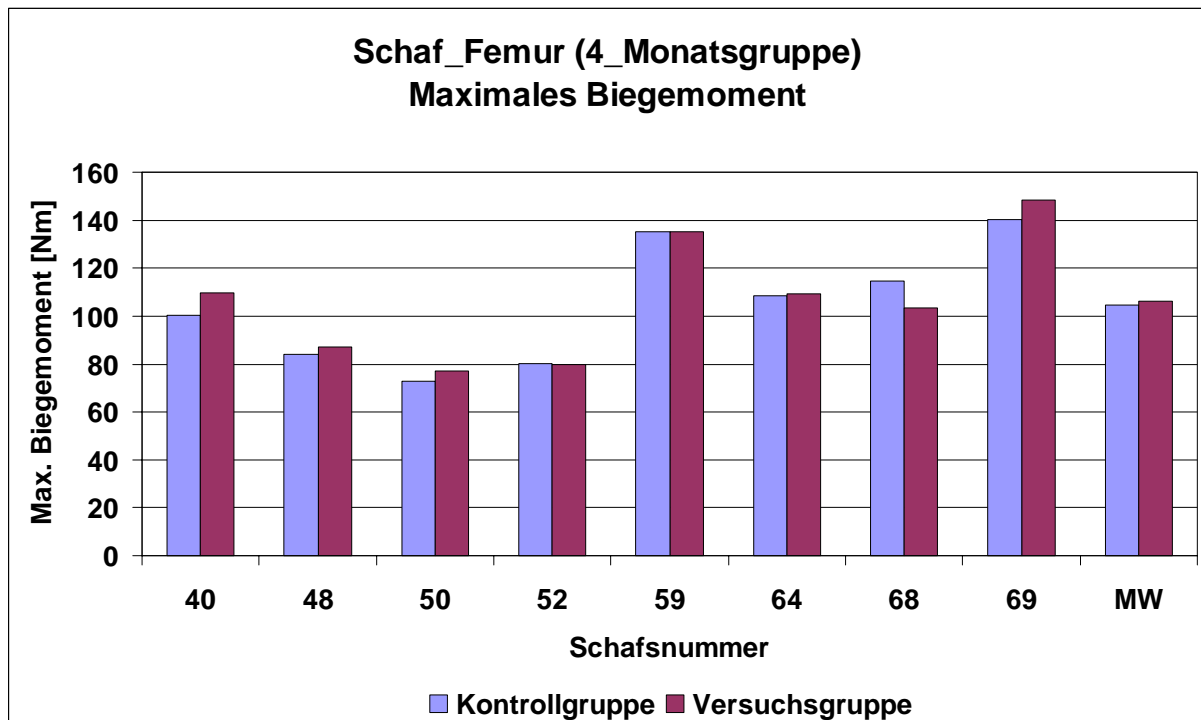


Abbildung 15: Maximales Biegemoment. Schaf – Femur – 4-Monatsgruppe

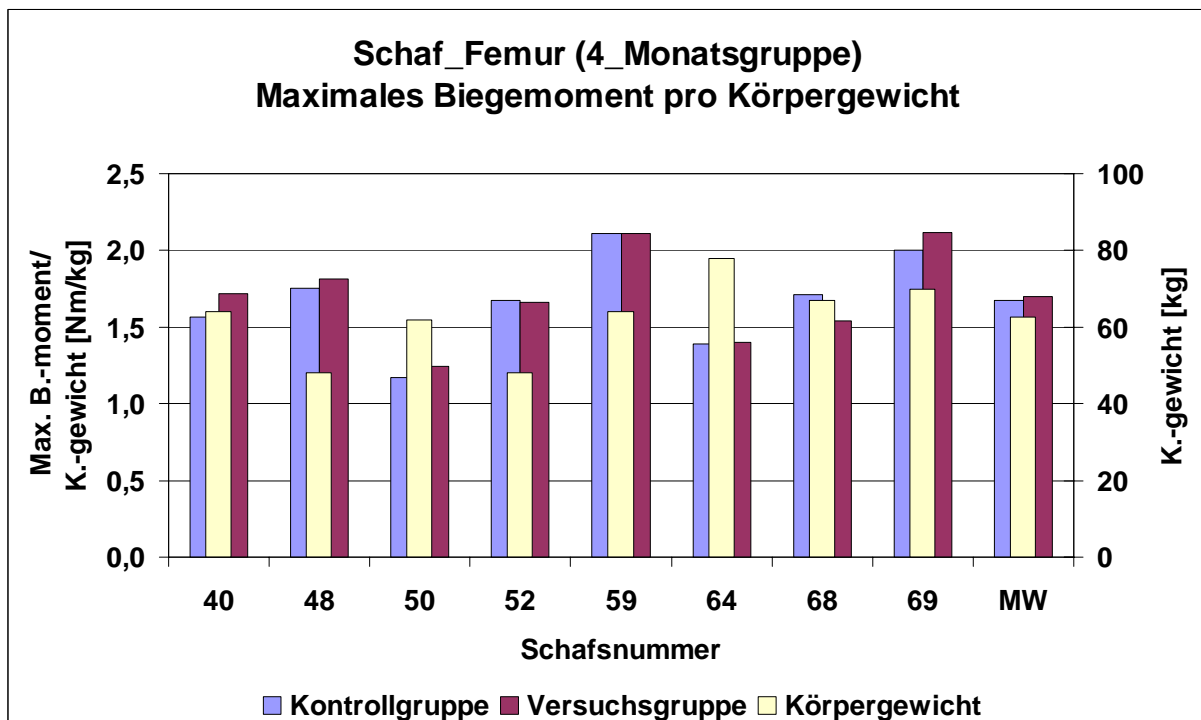


Abbildung 16: Maximales Biegemoment bezogen auf Körpergewicht. Schaf – Femur – 4-Monatsgruppe

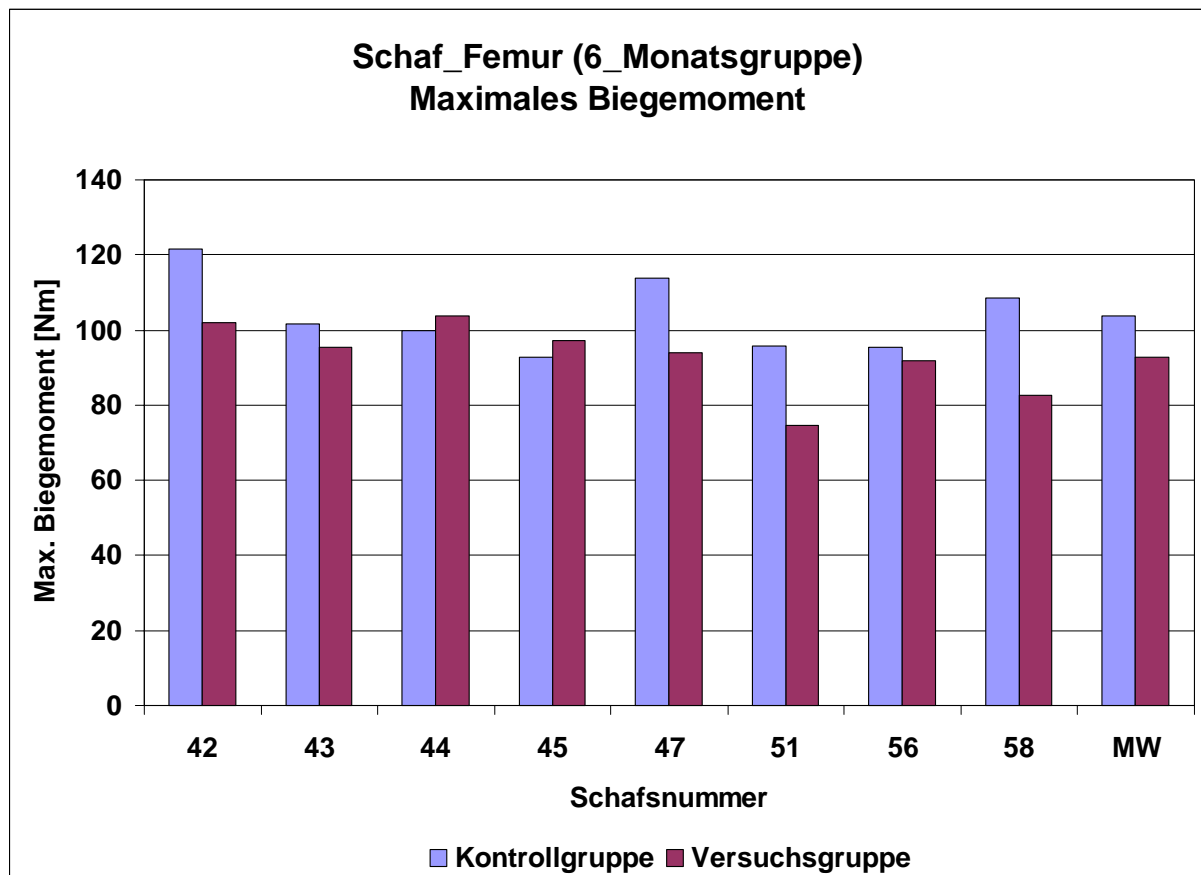


Abbildung 17: Maximales Biegemoment. Schaf – Femur – 6-Monatsgruppe

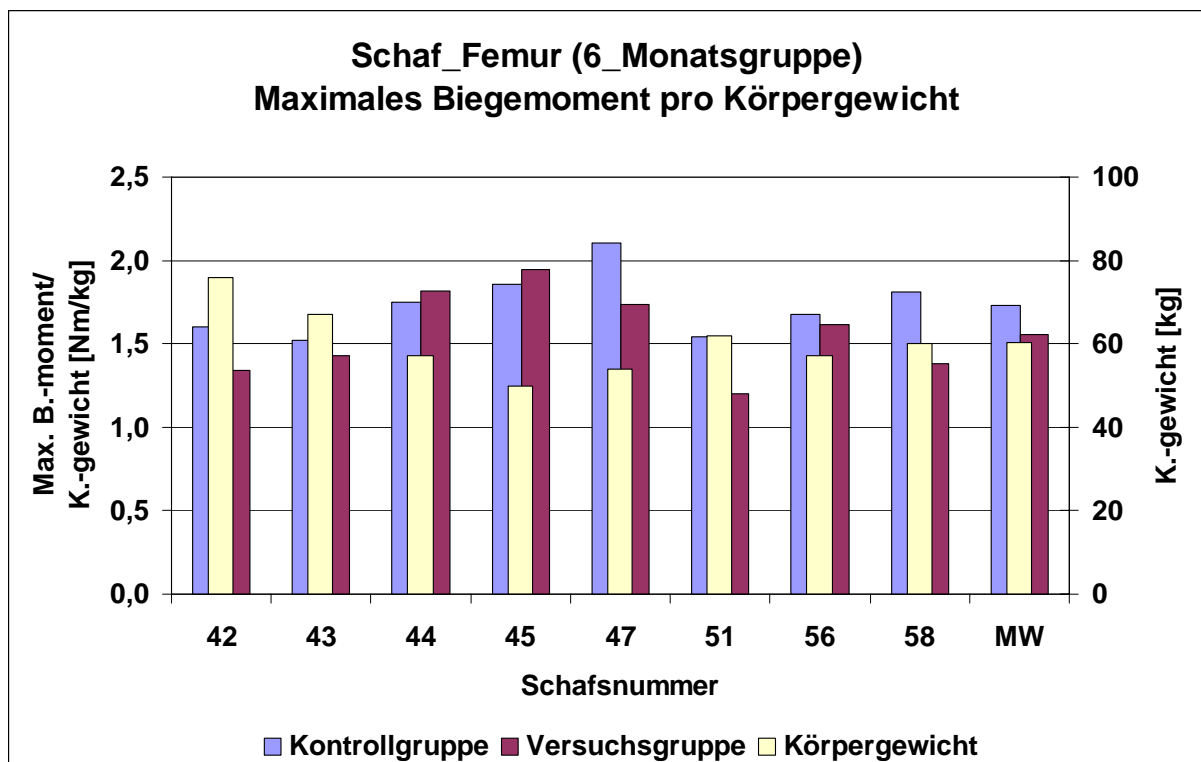


Abbildung 18: Maximales Biegemoment bezogen auf Körpergewicht. Schaf – Femur – 6-Monatsgruppe

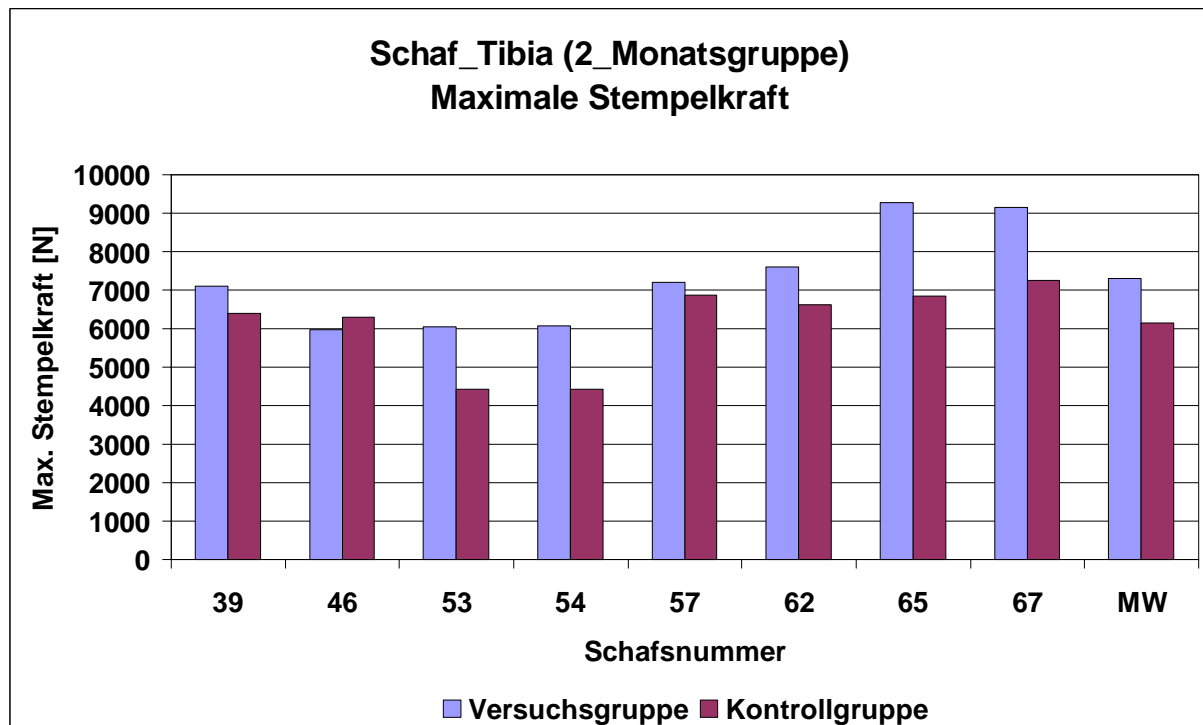


Abbildung 19: Maximales Stempelkraft. Schaf – Tibia – 2-Monatsgruppe

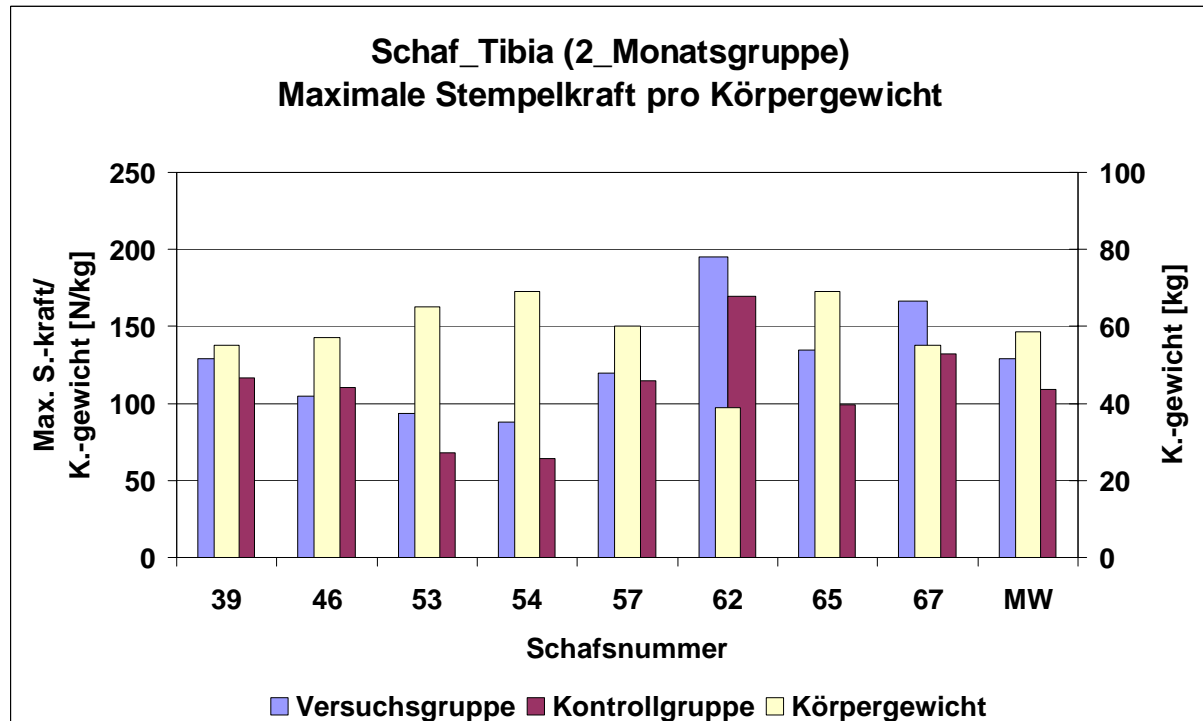


Abbildung 20: Maximales Stempelkraft bezogen auf Körpergewicht. Schaf – Tibia – 2-Monatsgruppe

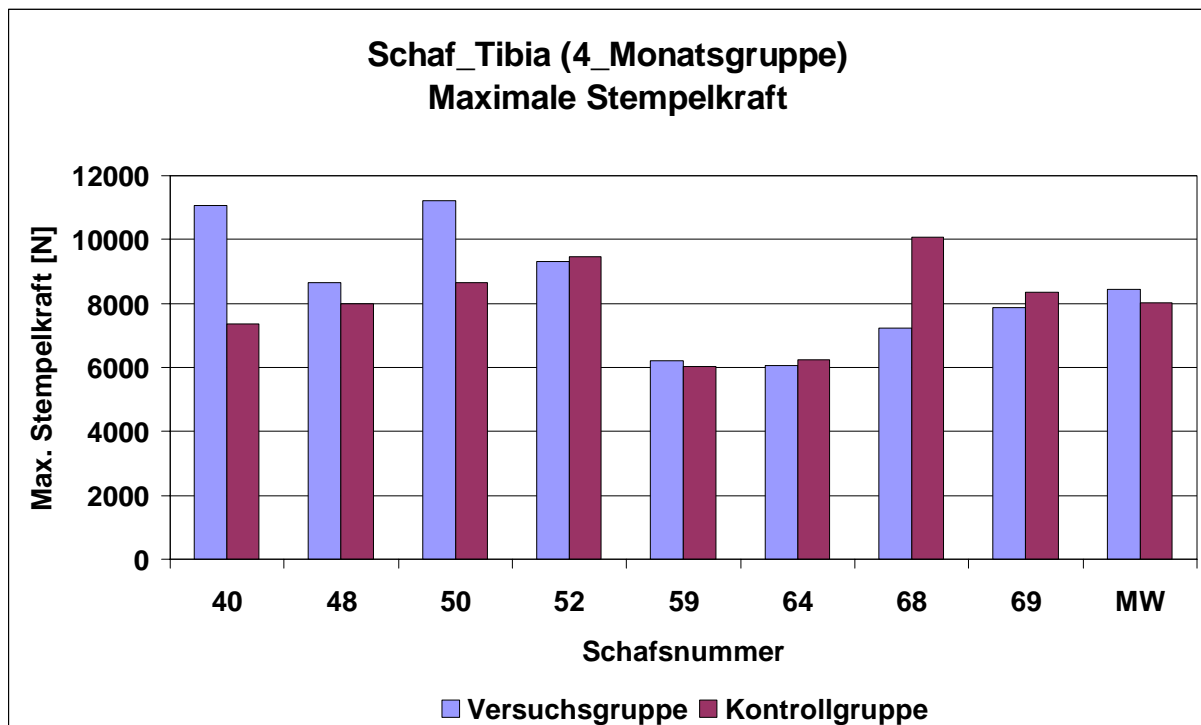


Abbildung 21: Maximales Stempelkraft. Schaf – Tibia – 4-Monatsgruppe

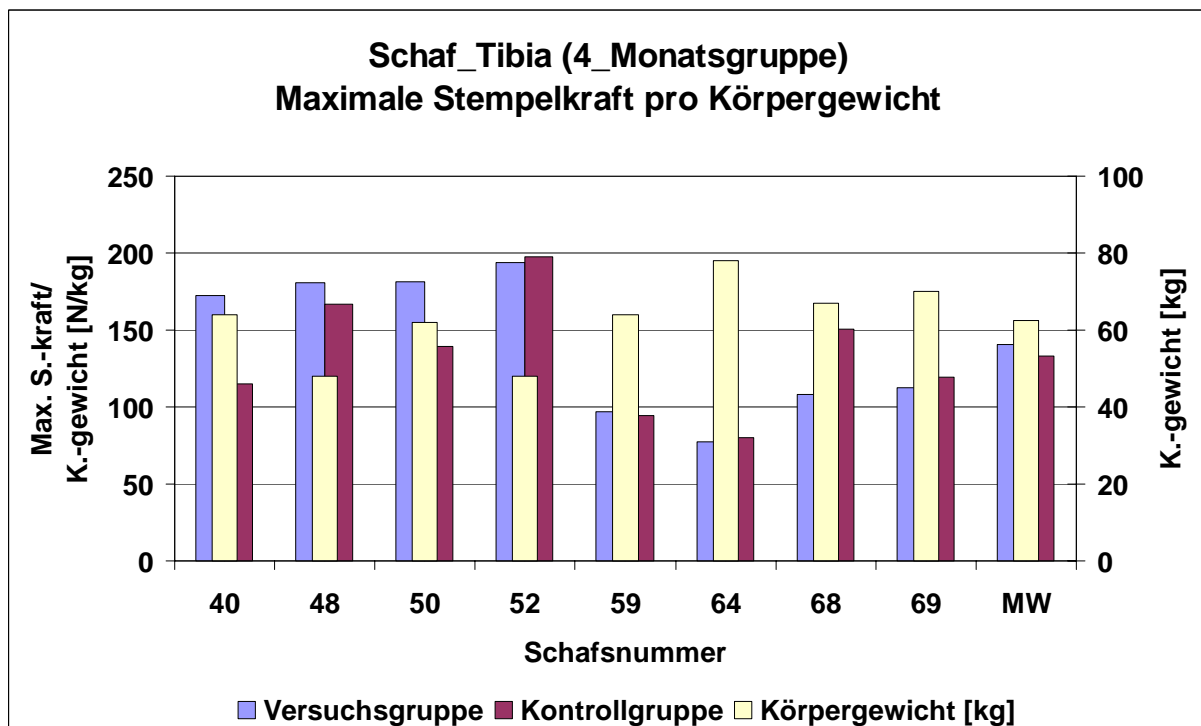


Abbildung 22: Maximales Stempelkraft bezogen auf Körpergewicht. Schaf – Tibia – 4-Monatsgruppe

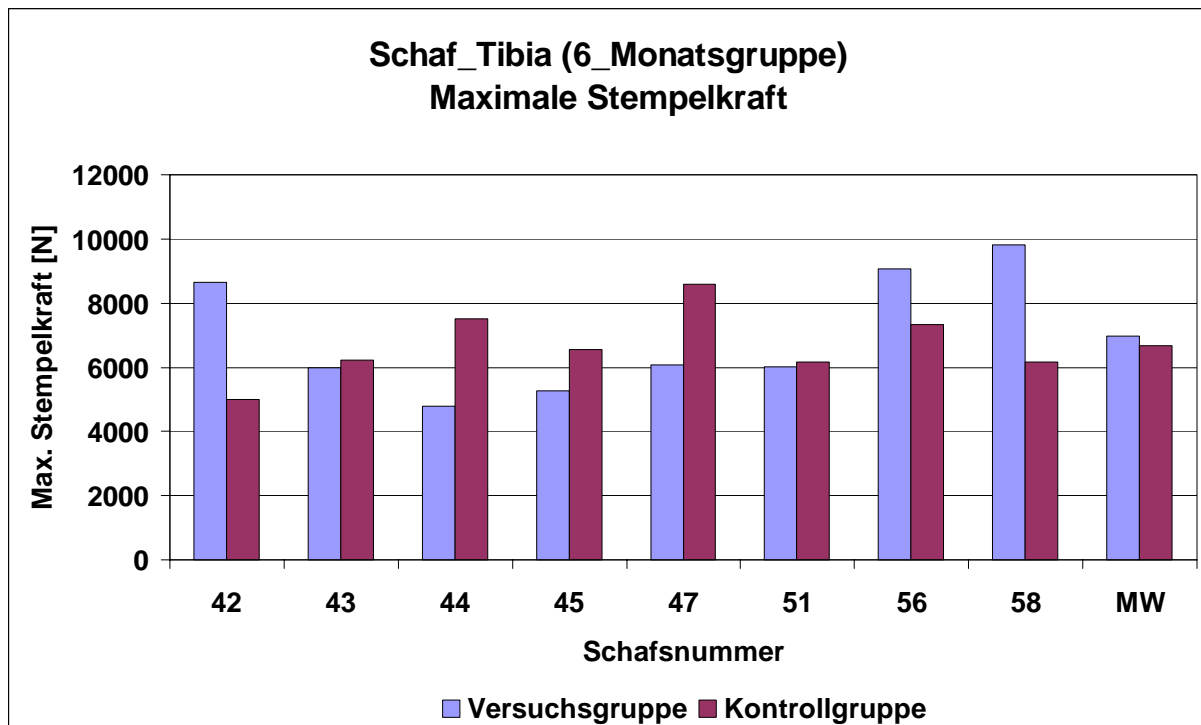


Abbildung 23: Maximales Stempelkraft. Schaf – Tibia – 6-Monatsgruppe

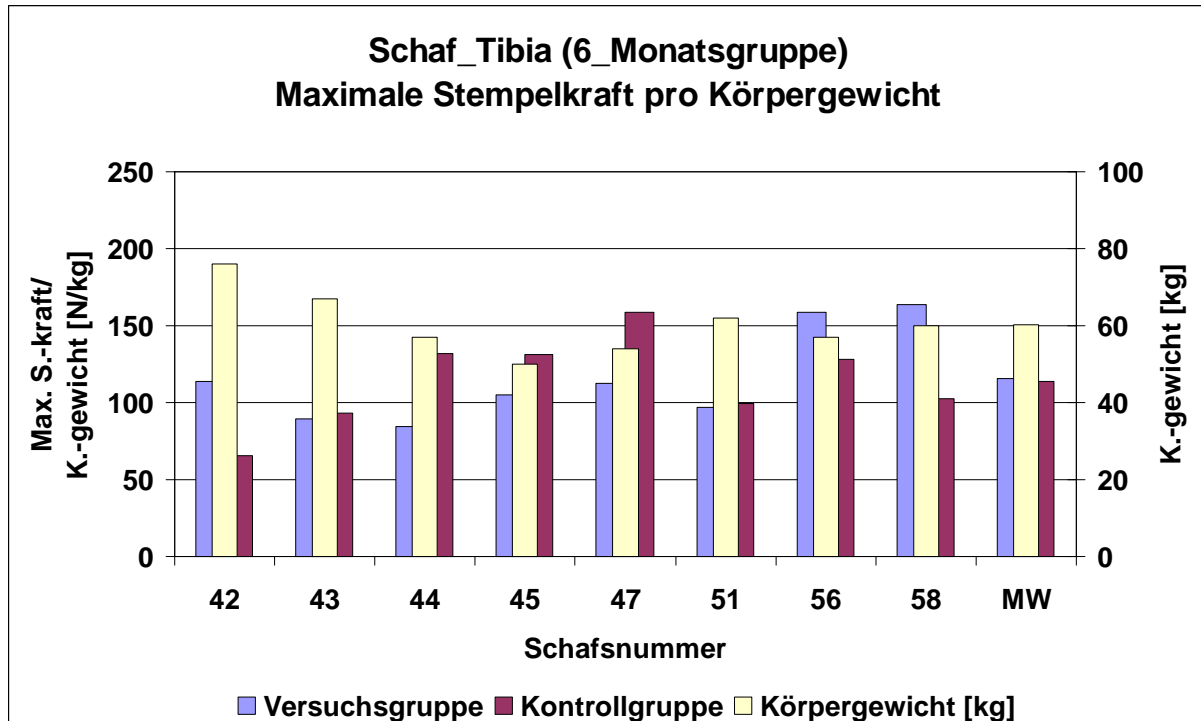


Abbildung 24: Maximales Stempelkraft bezogen auf Körpergewicht. Schaf – Tibia – 6-Monatsgruppe

Bei der Auswertung der maximalen Kompressionsbelastung an den Tibiae fand sich bei einer mittleren benötigten Kraft von 6385,6 N gegenüber durchschnittlich 7483 N (Kontrollseite) nach Ablauf von 2 Monaten eine signifikante Schwächung der operierten Seite ($p < 0,034$) (Tabelle 9-Tabelle 11, Abbildung 19-Abbildung 24). Auch die Korrelation der benötigten Kraft bis zum Eintritt der Fraktur mit dem Körpergewicht (Kg) der Tiere zeigte mit 115,7 N/Kg (rechte Tibia) gegenüber 134,8 N/Kg (Kontrollseite) eine signifikante Schwächung ($p < 0,043$).

Demgegenüber war die tolerierte Biegebelastung der kryochirurgisch behandelten Femora mit durchschnittlich 1106,8 N im Vergleich zur Kontrollseite (1193,7 N) nur tendenziell niedriger (Abbildung 13-Abbildung 18, Tabelle 6-Tabelle 8). Sowohl das absolute Biegemoment (94,6 Nm vers. 110,3 Nm) als das Biegemoment pro Kg/Körpergewicht (1,55 Nm/Kg vers. 1,80 Nm/Kg) zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschied zwischen der behandelten und der Kontrollseite.

Nach 4 Monaten war die Kompressionsstabilität der behandelten Tibiaköpfe noch immer um durchschnittlich 517 N bzw. 9 N/Kg niedriger, wobei der Unterschied nicht mehr signifikant war. Die für den Bruch benötigte Biegebelastung der behandelten Femora war mit 1156,3 N versus 1181,5 N (Kontrollseite) nahezu gleich. Auch für das maximale Biegemoment und das Biegemoment im Verhältnis zum Körpergewicht waren praktisch keine Unterschiede festzustellen.

Sechs Monate postoperativ war die benötigte Stempelkraft bis zum Eintritt der Kompressionsfraktur auf der kryoabladierten Seite um durchschnittlich 209,6 N bzw. 4,8 N/Kg höher als auf der Kontrollseite, ohne dass dieser Unterschied das Signifikanzniveau erreicht. Die Messung der Biegebelastbarkeit der behandelten Femora zeigte ähnlich wie die 4 Monate postoperativ durchgeführten Messungen nahezu seitengleiche Verhältnisse, wobei das behandelte linke Femur minimal weniger belastbar war.

3.2 Histologie

Nach Durchsicht der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop bei unterschiedlichen Wellenlängen zeigte sich, dass die erwartete Darstellung von Farbbanden im Knochengewebe nicht zu erkennen war, vielmehr war ein fließender Übergang zu sehen.

Um dennoch eine histologische Auswertung zu erzielen, wurden die fixierten und archivierten Restproben aller Tiere lamelliert, in EDTA entkalkt, in Paraffin eingebettet, geschnitten und einer konventionellen Histologie mit Haematoxylin-Eosin-Färbung unterworfen.

3.2.1 Histologische Auswertung

Farblegende:

- ➡ avitaler Lamellenknochen mit kernlosen Osteozyten
- ➡ neugebildeter Geflechtknochen mit Ostloblasten
- ➡ Fibrose
- ➡ nekrotisches Fettgewebe
- ➡ nekrotisches Bindegewebe

3.2.1.1 2-Monats-Gruppe – Femur

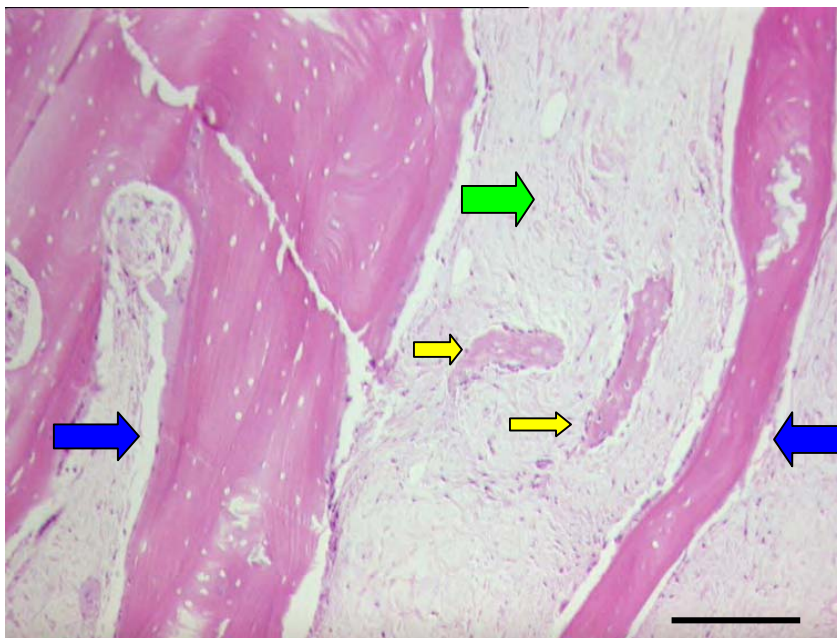


Abbildung 25: Ausgeprägte Zonen avitalen Knochengewebes mit ausgeprägter Fibrose, ggr. Knochenneubildung. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m

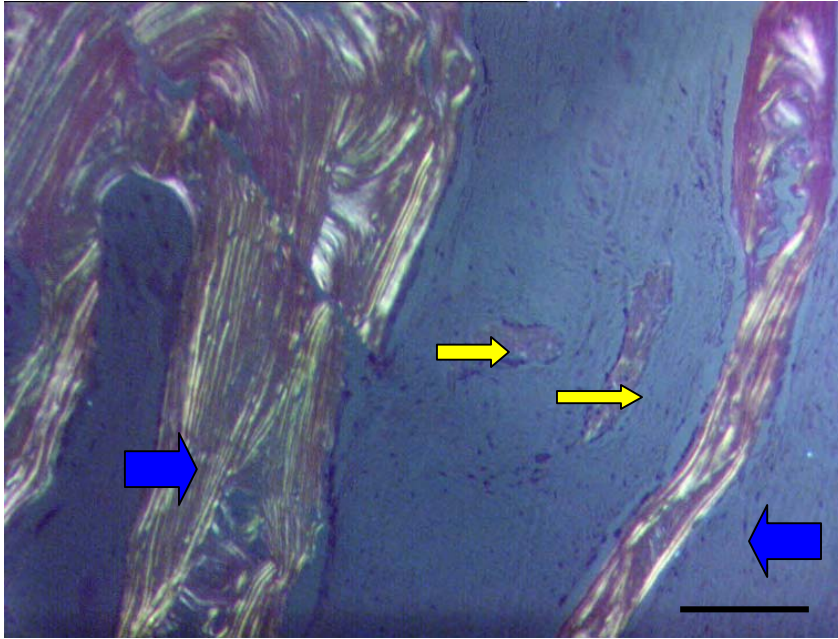


Abbildung 26: Ausgeprägte Zonen avitalen Knochengewebes mit ausgeprägter Fibrose, ggr. Knochenneubildung. Polarisationsoptische Aufnahme, Nachweis der kollagenen Fasern zur Unterscheidung zwischen Lamellen- und Geflechtknochen. Maßstabsbalken: 100 μm

3.2.1.2 2-Monats-Gruppe – Tibia

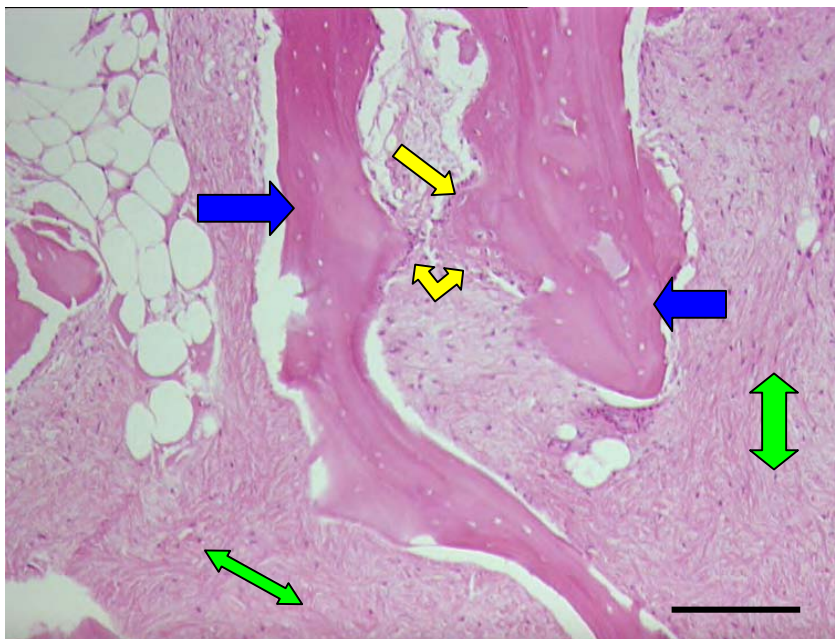


Abbildung 27: Avitaler Knochen mit geringgradigem vitalem Osteoblastensaum, ausgeprägte Fibrose. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μm

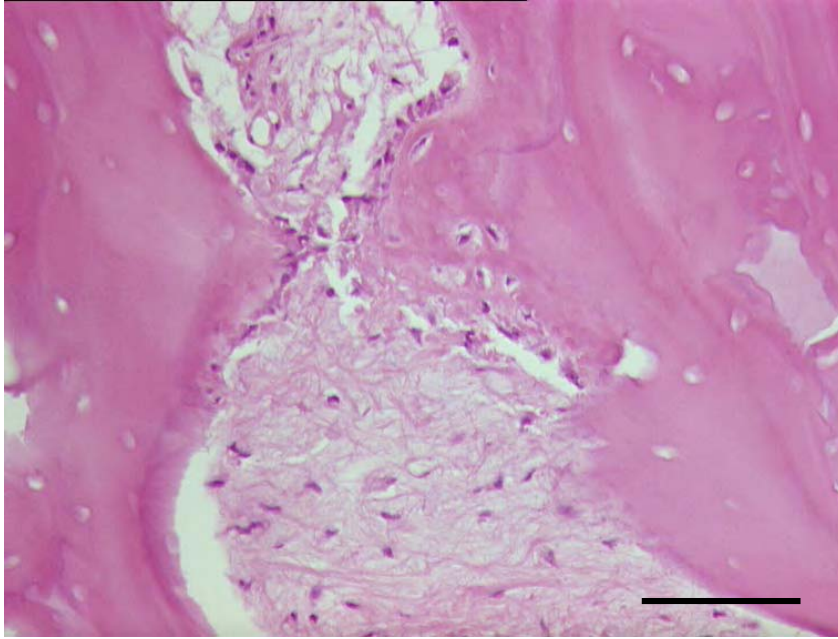


Abbildung 28: Detailaufnahme: Neubildung eines Osteblastensaums am avitalen Lamellenknochen. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μm

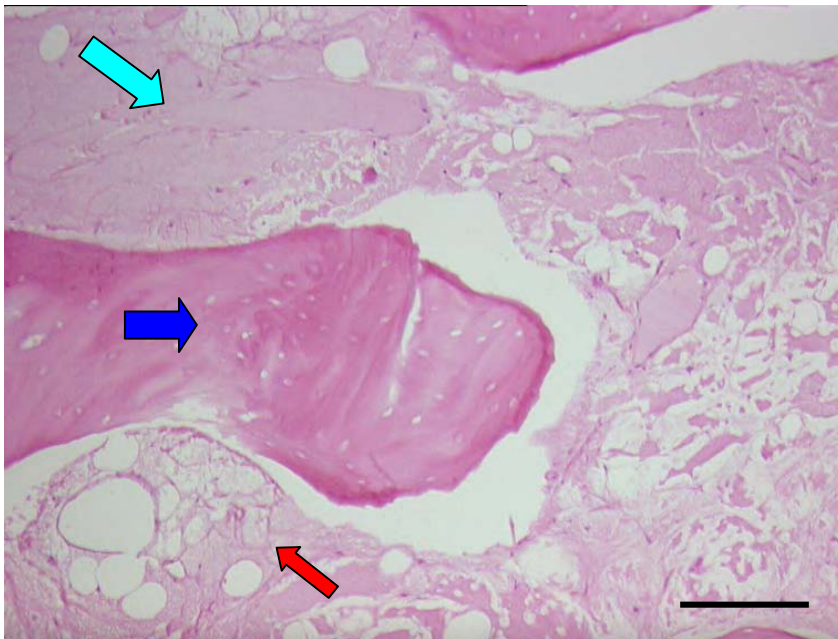


Abbildung 29: Vollständige Nekrose von Knochen-, Fett- und Bindegewebe infolge der Kryoschädigung. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μm

3.2.1.3 4-Monats-Gruppe – Femur

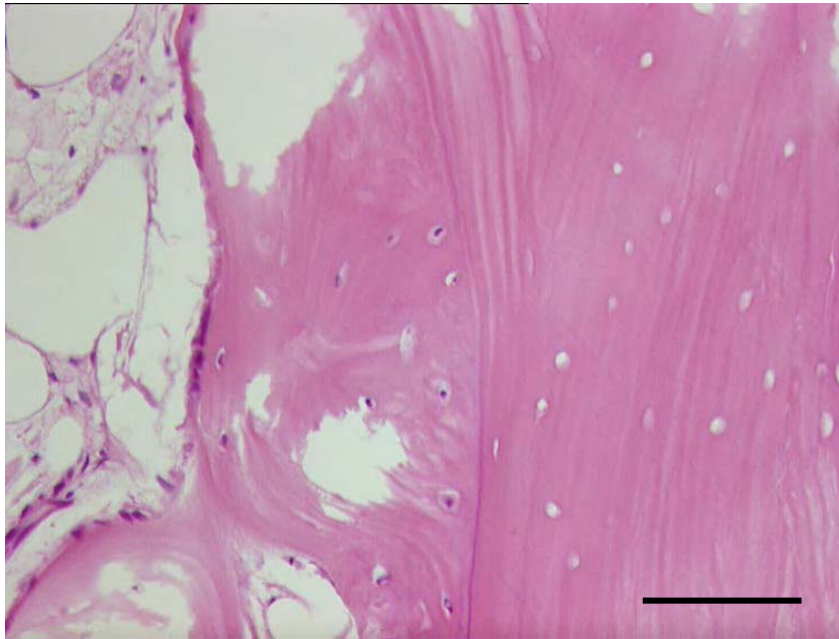


Abbildung 30: Avitaler und angelagerter vitaler Knochen mit kernhaltigen Osteoblasten. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μm

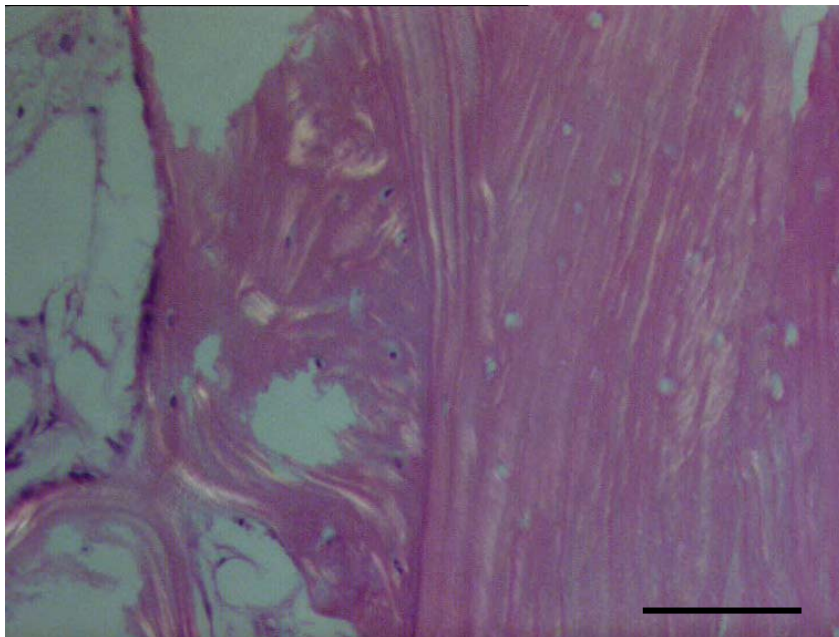


Abbildung 31: Polarisationsoptische Aufnahme: avitaler Lamellenknochen und neugebildeter vitaler Geflechtknochen. Maßstabsbalken: 50 μm

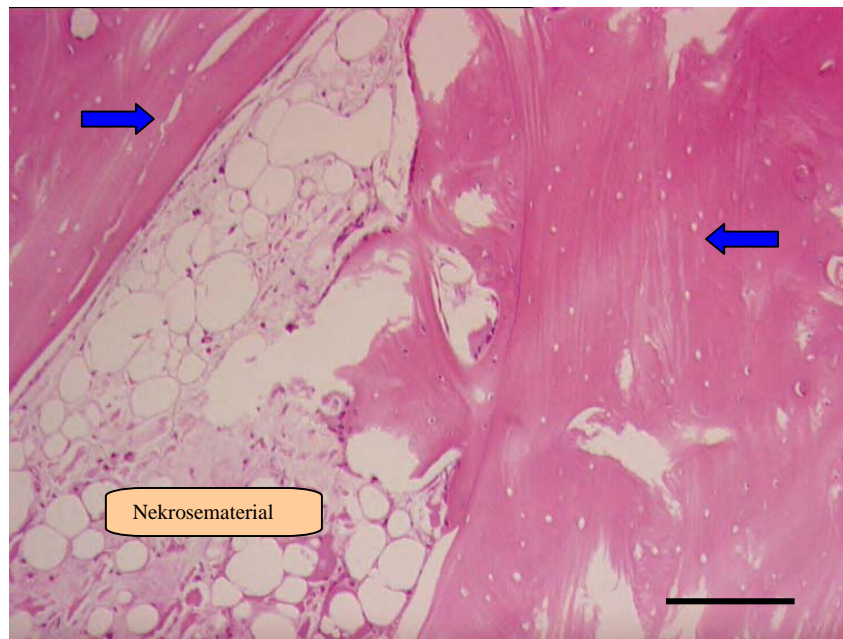


Abbildung 32: Avitaler Knochen mit Nekrosematerial im Markraum. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 µm

3.2.1.4 4-Monats-Gruppe – Tibia

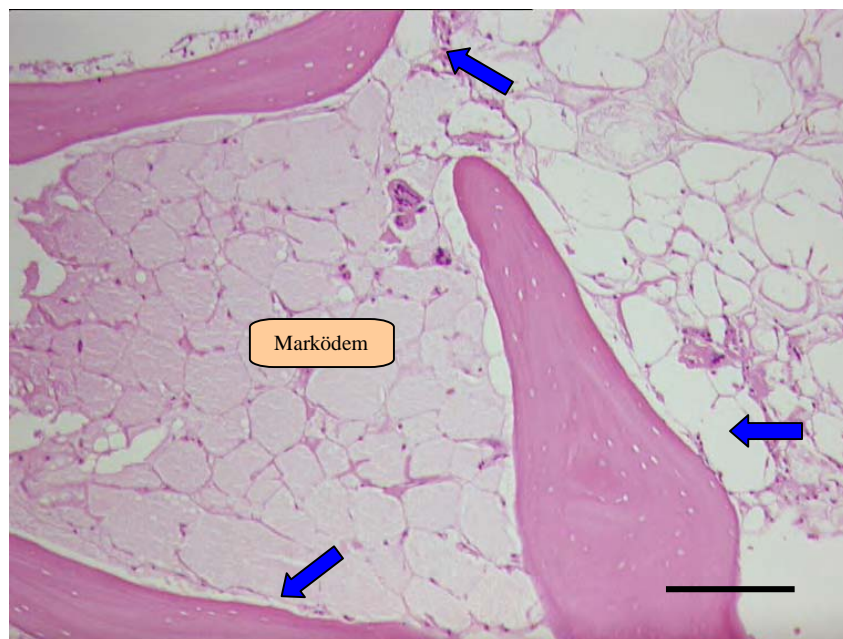


Abbildung 33: Avitaler Knochen mit Marködem infolge Kryoschädigung. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 µm

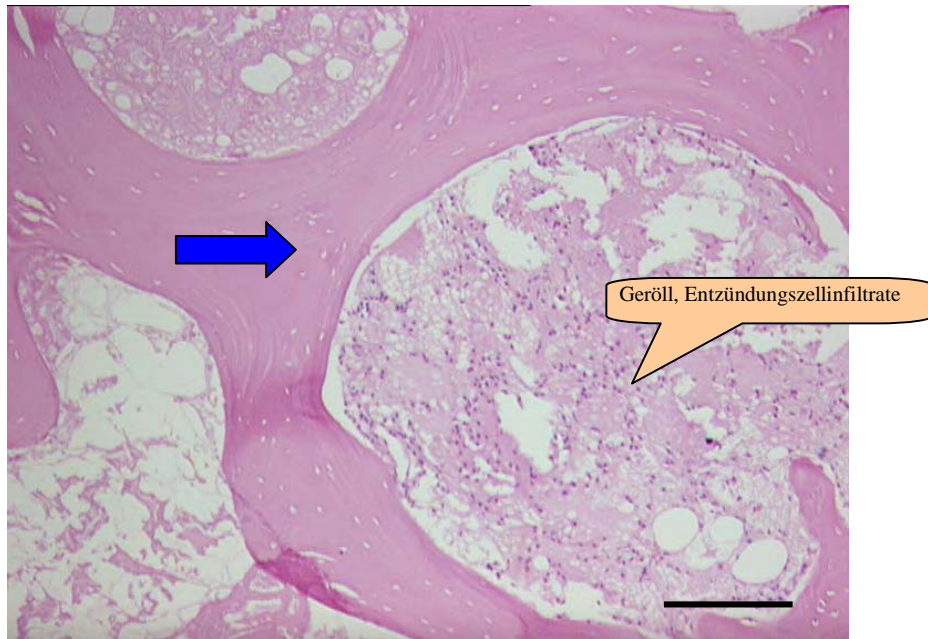


Abbildung 34: Avitaler Knochen, Geröll im Markraum mit geringgradigen Entzündungszellinfiltraten. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μm

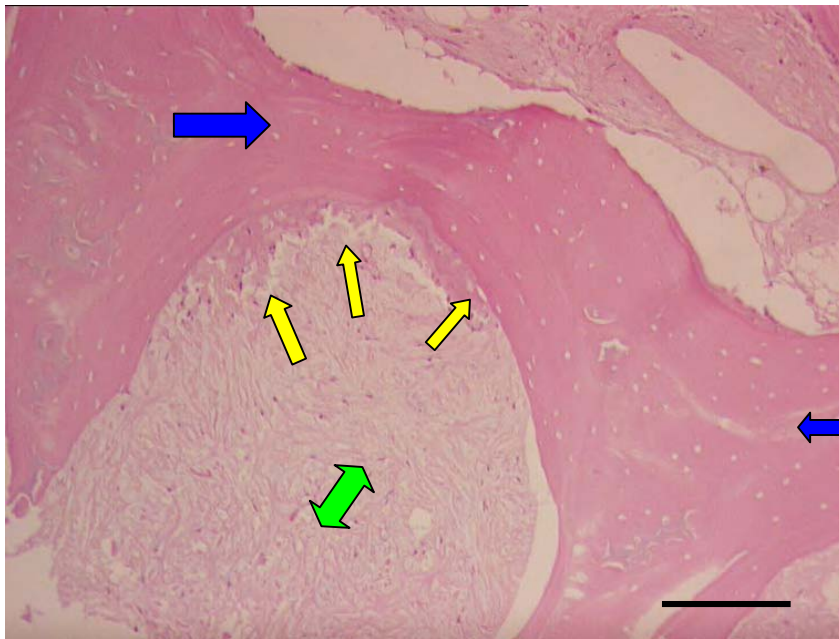


Abbildung 35: Avitaler Knochen-Anbau von Geflechtknochen, Fibrose. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μm

3.2.1.5 6-Monats-Gruppe – Femur

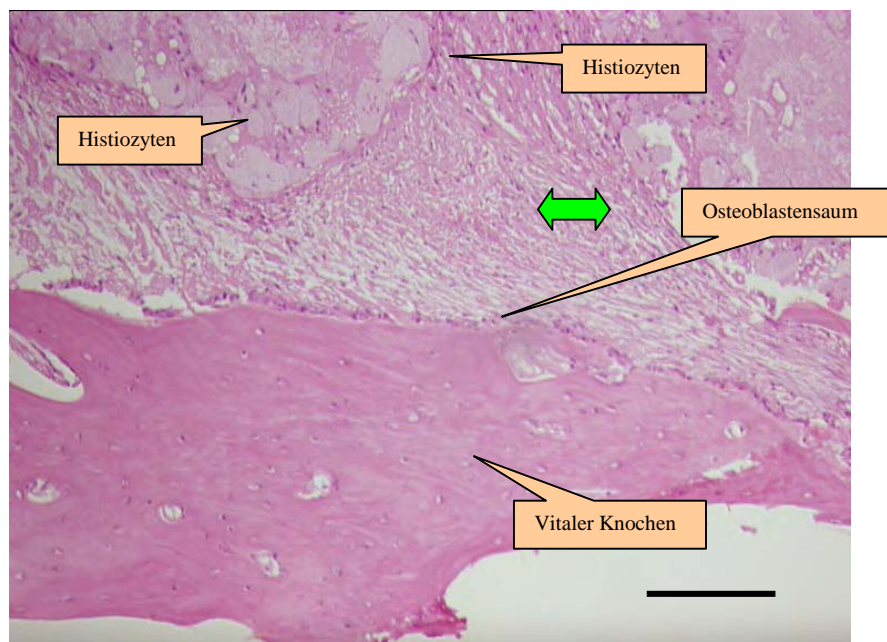


Abbildung 36: Breiter vitaler Knochen mit Osteoblastensaum, angrenzend Fibrose mit histiozytär-resorptiver Reaktion um Restnekrose. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m



Abbildung 37: Reste avitalen Knochengewebes ummantelt von neugebildetem Geflechtknochen. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μ m

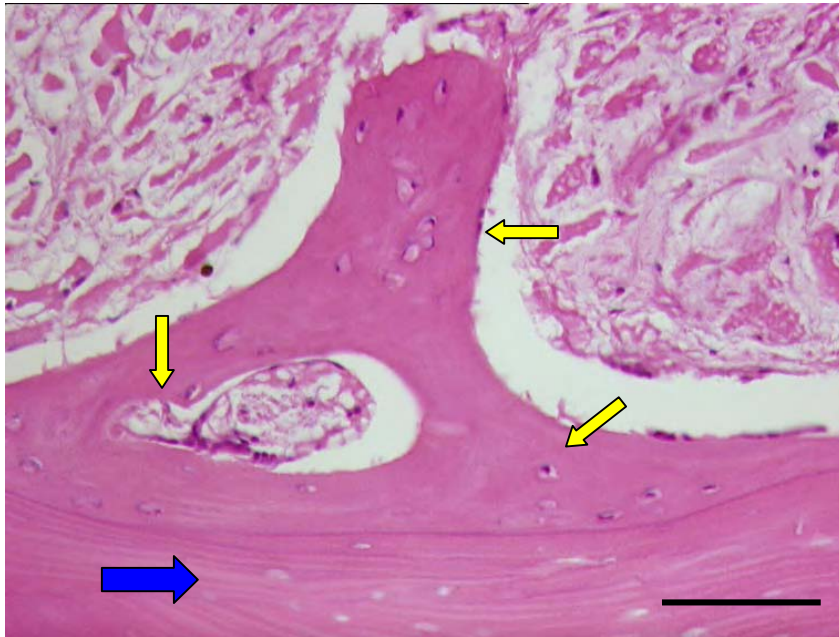


Abbildung 38: Bildung von vitalem Geflechtknochen; Geröll im Bild links und rechts oben vermutlich schnittbedingt. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μ m

3.2.1.6 6-Monats- Gruppe – Tibia



Abbildung 39: Oben rechts im Bild Geröll mit histiozytär-resorptiver Abräumreaktion. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m

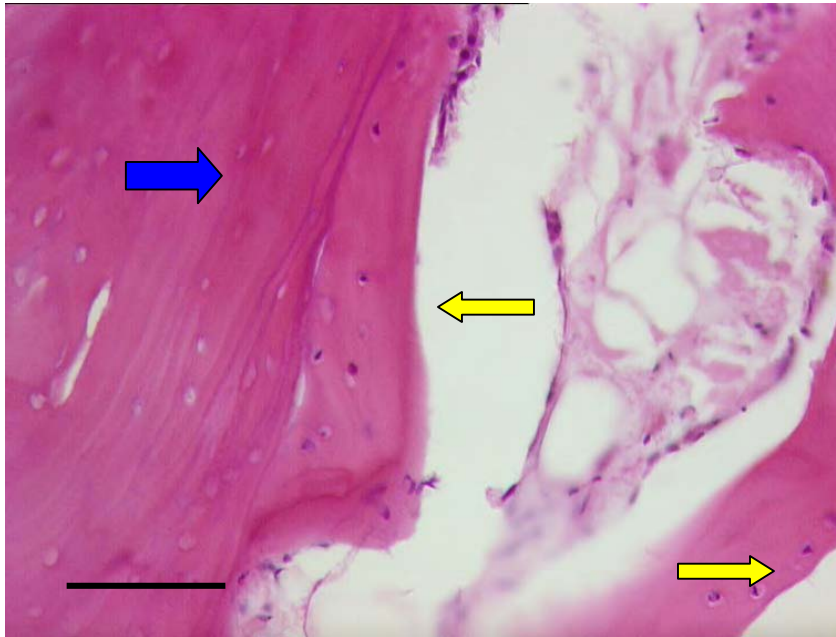


Abbildung 40: Übergang avitaler Lamellenknochen zu vitalem Geflechtknochen. HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μ m

3.3 Praktische Anwendung der Kryochirurgie zur Behandlung eines Osteosarkoms – Fallberichte

3.3.1 Fallbericht 1

Vorge stellt wurde ein 33 kg schwerer, 6 Jahre alter weiblicher, nicht kastrierter Boxermischling mit einer mittelgradigen Stützbeinlahmheit vorne links und einer geringgradigen Umfangsvermehrung im Bereich proximal des linken Karpalgelenks. Die Lahmheitsuntersuchung bestätigte die Lahmheit vorne links. Palpatorisch konnte eine Schmerzhaftigkeit im Bereich proximal des Karpalgelenks ausgelöst werden. Die angefertigten Röntgenaufnahmen zeigten im Bereich des distalen linken Radius einen Verlust der Kortikalisdicke mit unklar begrenzten Verschattungen im Bereich des umliegenden Weichteilgewebes. Karpalgelenk und Ulna erschienen röntgenologisch unauffällig. Der Thorax war röntgenologisch in beiden Ebenen (laterale Aufnahmen rechts und links anliegend) ohne besonderen Befund.

Das Blutbild war unauffällig. Alle Organparameter befanden sich im Normbereich. Die alkalische Phosphatase war mittelgradig erhöht (660 U/l).

Aufgrund der Verdachtsdiagnose, dass es sich um ein Osteosarkom handeln könnte, wurde der Patient mittels Computertomographie und Magnetresonanztomographie weiter abgeklärt (Abbildung 41).

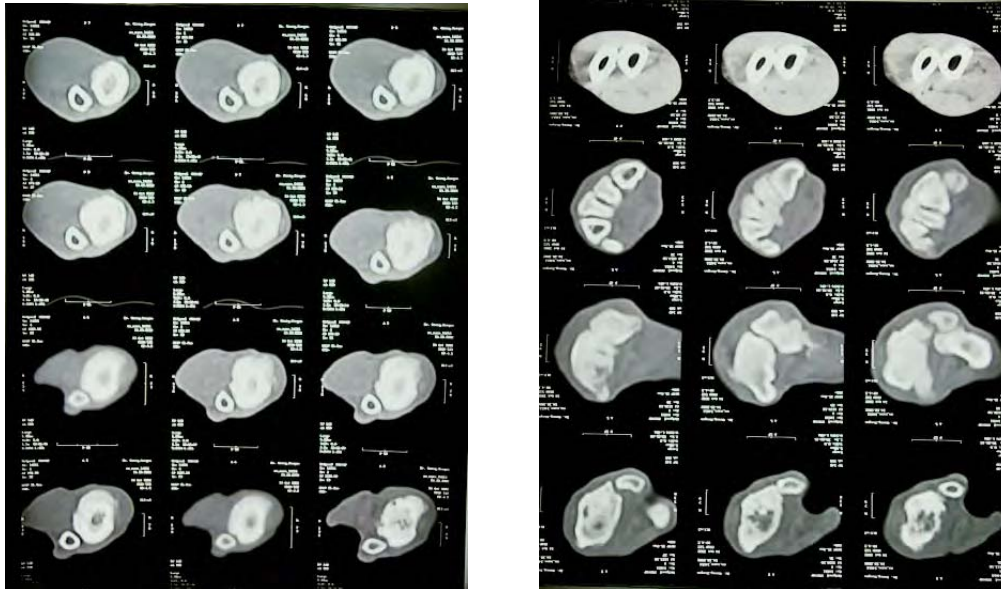


Abbildung 41: CT-Aufnahmen der betroffenen Gliedmaße: Im linken Bild sind die Veränderungen am distalen Radius dargestellt; die Ulna hingegen ist im gleichen Bereich unversehrt. Im rechten Bild zeigt sich, dass die Veränderungen nicht gelenkübergreifend sind.

Bei der magnetresonanztomographischen Untersuchung konnten folgende Befunde erhoben werden:

Es wurden Aufnahmen mit T1-Wichtung und T2-Wichtung inklusive Kontrastmittelanreicherung angefertigt. Es zeigte sich, dass die Tumorausbreitung am linken distalen Radius in unmittelbarer Nähe zum Karpalgelenk verlief. Die Ausdehnung der Neubildung betrug in der longitudinalen Ausbreitung 9 cm, in der diagonalen Ausbreitung erreichte der Tumor eine Dicke von maximal 3,5 cm Durchmesser. Die Ulna war offensichtlich nicht betroffen, auch nicht das umliegende Weichteilgewebe. Aufgrund der morphologischen Veränderungen und der typischen Periostabhebung sprachen die erhobenen Befunde ebenfalls für das Vorliegen eines Osteosarkoms.

Bei der Biopsientnahme wurde folgender histologischer Befund erhoben:

Zur Einsendung gelangten zwei grau-beige bis bräunlich gefärbte Gewebeproben. Die Proben hatten eine Größe von 1,1 x 1,0 x 0,5 cm bzw. 0,6 x 0,3 x 0,3 cm. Das Gewebe war weich-elastisch und auf der Schnittfläche graurötlich gefärbt.

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Proben halbiert und in toto eingebettet.

Die dabei erhobenen Befunde zeigten, dass die Tumorbildung ganz überwiegend aus unreifen polymorphen Fibroblasten-ähnlichen Zellen besteht. Von diesen werden überwiegend proteoglykanartige Substanzen gebildet. Deshalb kommt es im Interzellularraum zu einer stärkeren Wasserbindung. Daneben zeigen sich aber auch Neubildungen von bälkchenartig strukturiertem Knochen bzw. von amorphem Osteoid. Aufgrund der zellmorphologischen Befunde handelt es sich um ein hochmalignes Osteosarkom. Dabei kommt es zu einer starken Destruktion und Einschmelzung der vorbestandenen Knochenstrukturen. Im Tumor selbst waren außerdem ausgedehnte Nekrosen und Blutungsfelder erkennbar.

Aufgrund vorliegender Befunde wurde ein kryochirurgischer Eingriff an der betroffenen Gliedmaße vorgenommen.

Die Prämedikation erfolgte mit 35 mg Diazepam (Diazep von ct[®], ct-pharma), 8,0 ml Levomethadon (Polamivet[®], Intervet) und 1 mg Atropin via Zentralvenenkatheter; die Sedation wurde mit Propofol (Rapinovet[®], Essex Tierarznei) nach Bedarf aufrecht erhalten.

Nach Intubation wurde der Hund an eine Druckbeatmung zur Narkose angeschlossen. Der Sauerstoffflow betrug 8 Liter/min bei einem Mischungsverhältnis mit Isofluran von 4 Volumenprozent über Verdampfer. Die Kontrolle der Vitalfunktionen erfolgte mittels Kapnographie, Pulsoxymetrie, EKG-Monitoring und viertelstündlichen Blutgasanalysen.

Der Hund wurde prae OP antibiotisch mit 50 mg Amoxicillin (Amoxi Inject[®], WDT) und 200 mg Enrofloxacin (Baytril[®], Bayer Vital) sowie antiphlogistisch mit 250 mg Metamizol (Vetalgin[®], Boehringer Ingelheim) abgedeckt. Zur Stabilisierung des Kreislaufs wurden 500 ml Ringer-Laktat-Lösung mit Kaliumkorrektur verabreicht.

Die Lagerung erfolgte in Brustlage mit Ausbindung aller Gliedmaßen exklusive der betroffenen (Abbildung 42). Nach großflächiger zirkulärer Rasur und Desinfektion der umliegenden Hautpartien sowie steriler Abdeckung des OP-Feldes erfolgte der Hautschnitt dorsomedial distal beginnend am distalen Rand des Karpalgelenks bis zur Mitte des Unterarms (Abbildung 43- 44).

Die Präparation erfolgte unter Schonung größerer Gefäße und Nerven; die tiefe Strecksehne wurde mobilisiert und nach lateral verlagert. In den Radius wurden im Abstand von jeweils 2 cm 5 Bohrlöcher mit dem Durchmesser von jeweils 4 mm monokortikal gebohrt. Das erste Bohrloch wurde unmittelbar am Gelenkspalt gesetzt, nach proximal wurde ein maximaler Sicherheitsabstand im gesundem Knochengewebe von 2 cm festgelegt (Abbildung 45).



Abbildung 42: Lagerung und Monitoring



Abbildung 43: Zirkuläre Rasur des OP-Feldes



Abbildung 44: Schnitt und Präparation



Abbildung 45: Darstellung der Bohrkanäle

Nach Einbringen der Kryosonden in den Radius und Vorschieben derselben bis auf die Gegenkortikalis wurde der Frierzyklus unter größtmöglicher Schonung des umliegenden Weichteilgewebes begonnen.

Im Zyklus 1 wurde eine Frierung über 3 Minuten bis Erreichen von -180°C vorgenommen (Messzeitpunkt). Der eigentliche Friervorgang im Zyklus 1 erfolgte über einen Zeitraum von 13 Minuten bei Temperaturen von unter -180°C in allen 5 Sonden. Darauf wurde das Gewebe etwa 8 Minuten getaut bis zum Erreichen des Nullpunkts.

Im zweiten Zyklus wurden Temperaturen von -180°C nach 40 Sekunden erreicht (Messzeitpunkt). Der eigentliche Friervorgang in Zyklus 2 erfolgte über einen Zeitraum von 10 Minuten bei -180°C in allen 5 Sonden (Abbildung 46-Abbildung 47). Der Tauvorgang von Zyklus 2 erfolgte passiv bis zur Möglichkeit der manuellen Entfernung der Sonden (Abbildung 48).



Abbildung 46: Positionierte Sonden



Abbildung 47: Friervorgang



Abbildung 48: Zustand nach Sondenentfernung

Der Wundverschluss erfolgte mit Vicryl 2/0; Hautnaht erfolgte mit Prolene 1. Wundschutz wurde mit Aluspray und abdeckendem Verband sicher gestellt (Abbildung 49).



Abbildung 49: Aufnahme unmittelbar post OP

Die unmittelbare postoperative Phase verlief ohne Komplikationen. Der Hund wurde antibiotisch abgedeckt mit Amoxicillin + Clavulansäure (Synulox[®], Pfizer) und Enrofloxacin

(Baytril[®], Bayer Vital). Als Antiphlogistikum wurde Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer) angewandt.

Ein Verbandswechsel erfolgte in zweitägigen Abständen. Der Allgemeinzustand des Tieres konnte als sehr gut bezeichnet werden. Die Futteraufnahme war gut und die Besitzer hatten auf Nachfrage nicht den Eindruck von besonderen Schmerzreaktionen. Die betroffene Gliedmaße wurde belastet. Im weiteren Verlauf entwickelte sich einige Tage post OP eine großflächige Nekrose der Haut, die nicht beherrschbar war (Abbildung 50 -Abbildung 53).

Vierzehn Tage post OP musste aus tierschutzrechtlichen Gründen eine Amputation der Gliedmaße erfolgen. Die Amputation wurde im proximalen Humerusbereich nach den Regeln der tierärztlichen Kunst vorgenommen. Die Wundheilung erfolgte komplikationslos.

Die betroffene Gliedmaße wurde gesichert und für weitere diagnostische Zwecke in Formalinlösung fixiert.

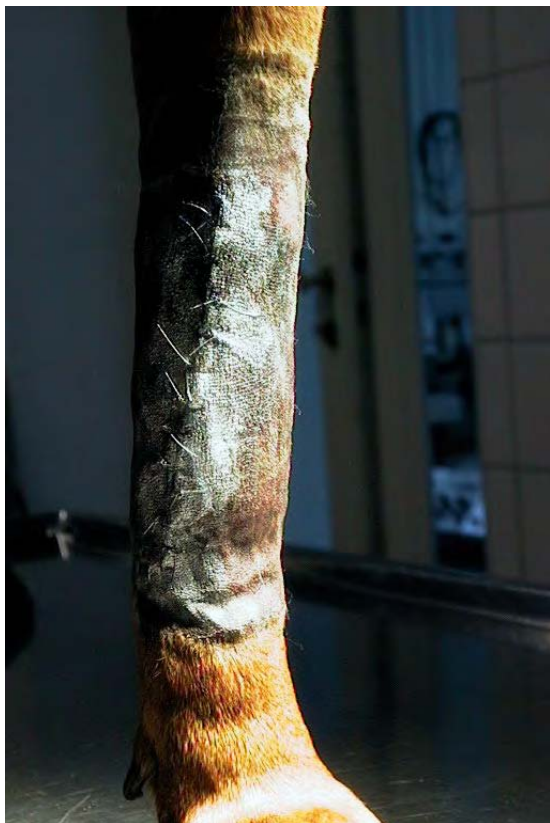


Abbildung 50: Zustand 4 Tage post OP



Abbildung 51: Größenvergleich links-rechts



Abbildung 52: Zustand 8 Tage post OP



Abbildung 53: Zustand 12 Tage post OP

Elf Monate post OP wurde der Hund aufgrund von Husten erneut vorgestellt. Die Röntgenaufnahmen wiesen multiple deutliche Rundschaten im Lungenfeld auf (Abbildung 54). Es musste von Metastasenbildung in der Lunge ausgegangen werden. Es wurde eine palliative Therapie mit täglicher Gabe von Prednisolon in der Dosierung von 2 mg/kg KG durchgeführt. Das Tier wurde aufgrund der Lungenproblematik 14 Monate post OP euthanasiert.



Abbildung 54: Röntgenbefunde Thorax 11 Monate post OP

Histologische Auswertung der Gliedmaße:

Bei der nachfolgenden histologischen Auswertung konnten histopathologisch keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden. Es wurde, wie gewollt, eine ausgedehnte Nekrose der Tumormasse festgestellt.

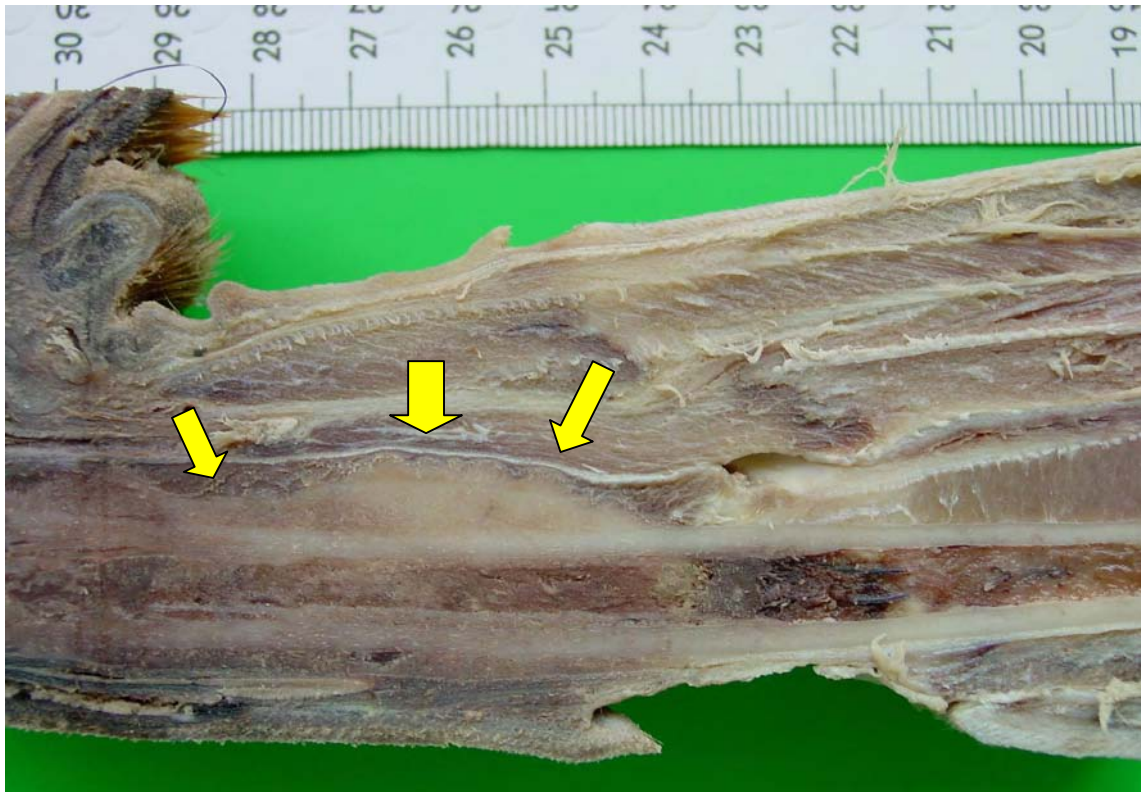


Abbildung 55: Längsschnitt durch den gesamten Radius am Tag der Amputation (14 Tage post OP)

Eine kompakte Tumormasse im enchondralen Markraum mit Zerstörung der Spongiosa und des Knochenmarkes ist zu erkennen. Besonders einseitig (Abbildung 55, Pfeile): Durchbrechung der Kortikalis und Ausbreitung des Tumorgewebes zwischen Knochenaußenfläche und angrenzender Skelettmuskulatur. Auf der linken Bildseite: invasives Vordringen des Tumors.

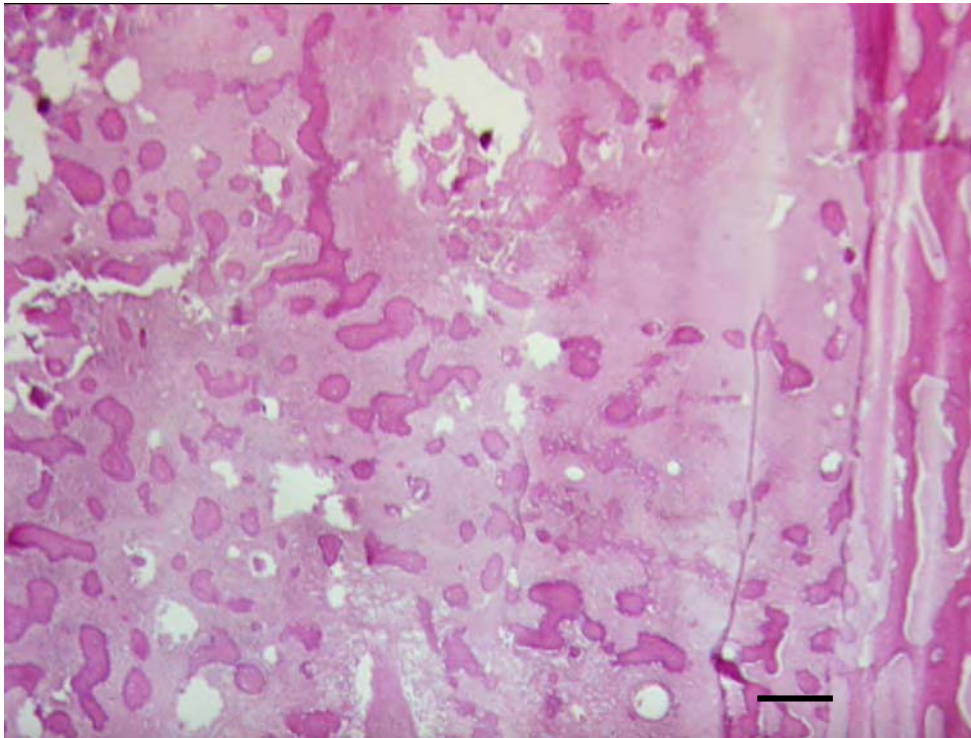


Abbildung 56: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m

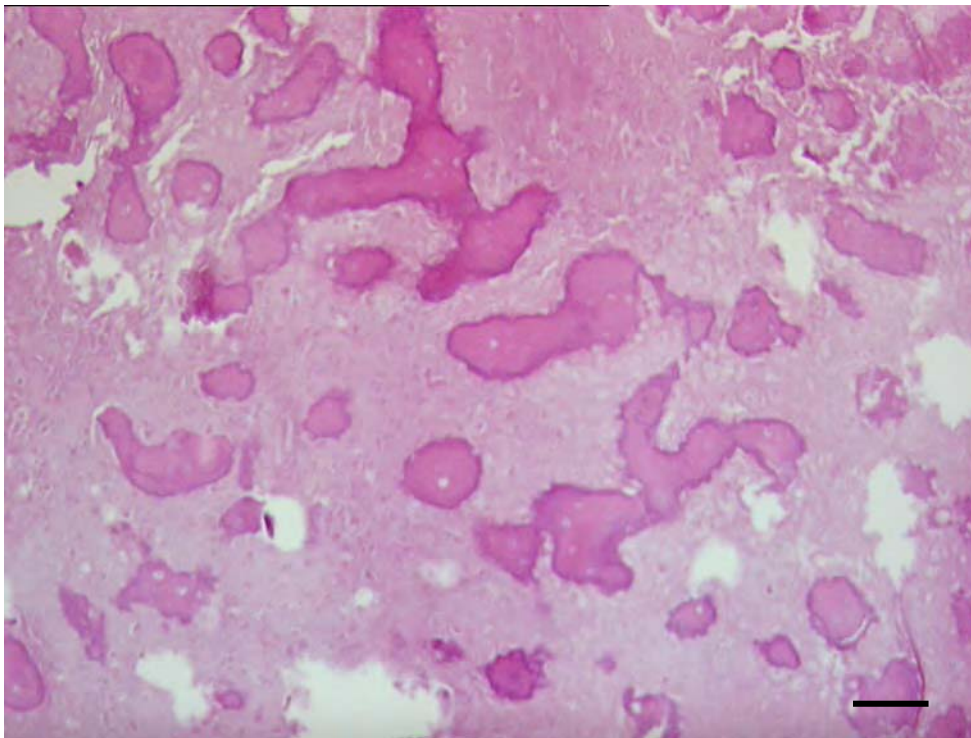


Abbildung 57: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μ m

Histologische Schnittpräparate vom Tumorgewebe 14 Tage nach der kryochirurgischen Behandlung zeigen Tumorgewebe an der Außenfläche des Radius (Abbildung 56).

Zahlreiche neugebildete Knochenbälkchen aus dem Inneren des Tumors mit deutlicher Nekrose sind zu sehen (Abbildung 57). Dazwischen zell- und faserreiches Tumorgewebe ebenfalls weitgehend abgestorben. Stromale Entzündungs- oder Reparationsvorgänge sind in keiner Lokalisation erkennbar.

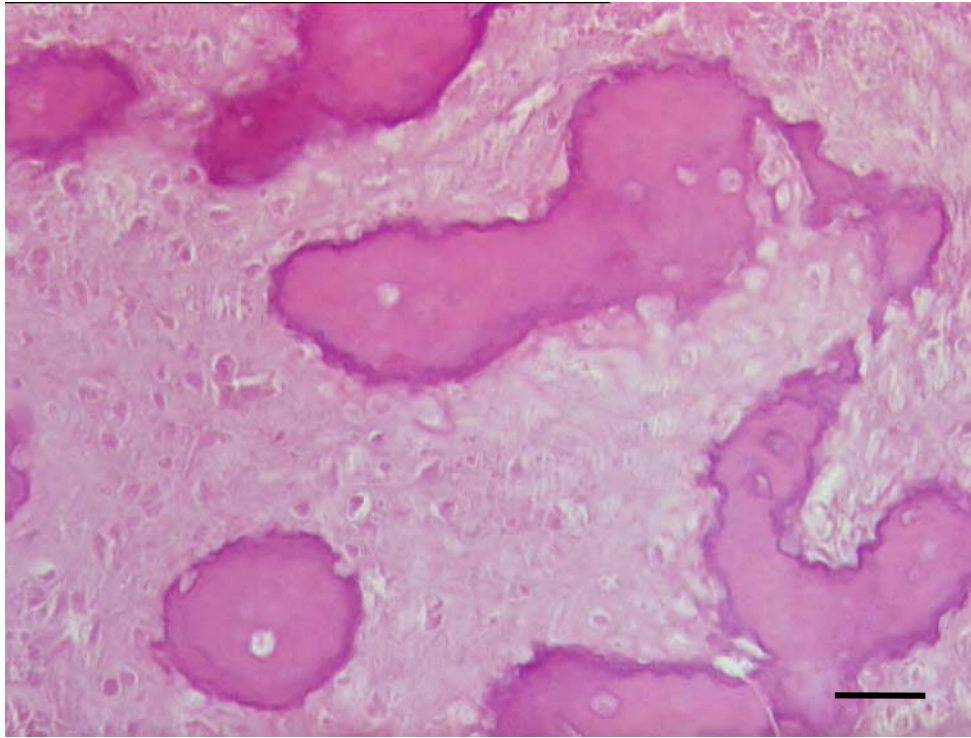


Abbildung 58: Ausschnittvergrößerung von Abbildung 57. Maßstabsbalken: 20 μ m

In den Knochenbälkchen des Tumorgewebes finden sich nur vereinzelt geschrumpfte osteozytenartig ausgereifte Tumorzellen bei strukturell weitgehend erhaltener mineralisierter Knochenmatrix. Im dazwischen gelegenen zellreichen Tumorgewebe: nur noch schattenhaft Reststrukturen der hier häufiger spindelförmigen Sarkomzellen (Abbildung 58).

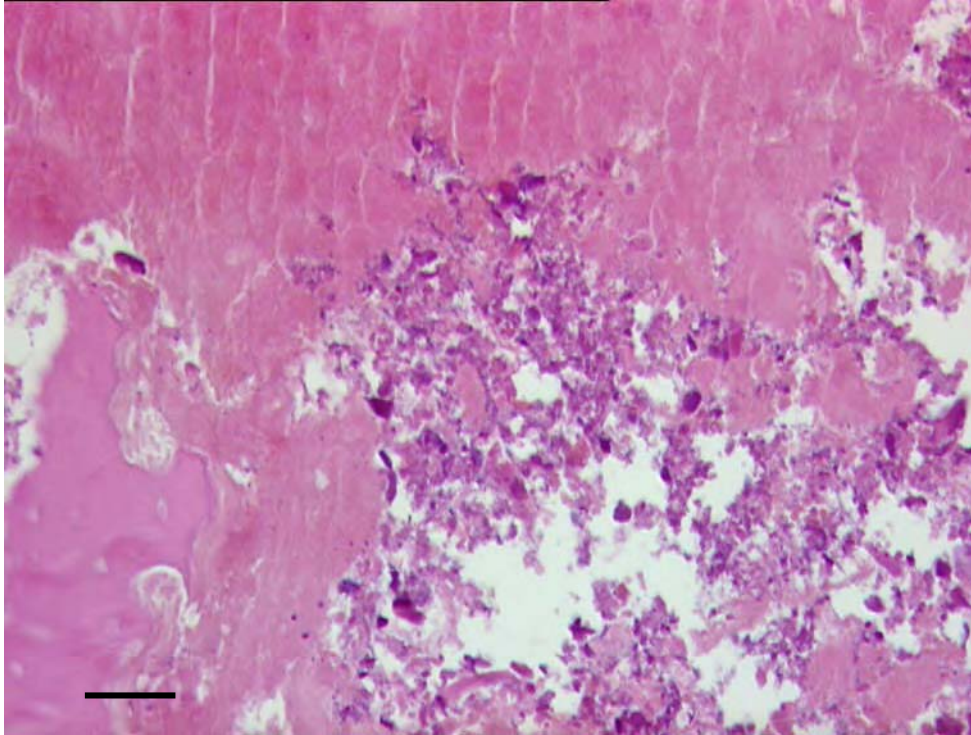


Abbildung 59: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 20 μ m

In Abbildung 59 links erkennt man eine nekrotische Knochenstruktur aus dem Innenbereich des Tumors. Alle restlichen Bildteile zeigen nekrotische Weichgewebsanteile mit vollständiger Auflösung der Zell- und Gewebsstrukturen. Zusätzlich: großflächige, meist herdförmige dystrophische Kalkausfällungen im nekrotischen Weichgewebe des Tumors (blaue granuläre Niederschläge).

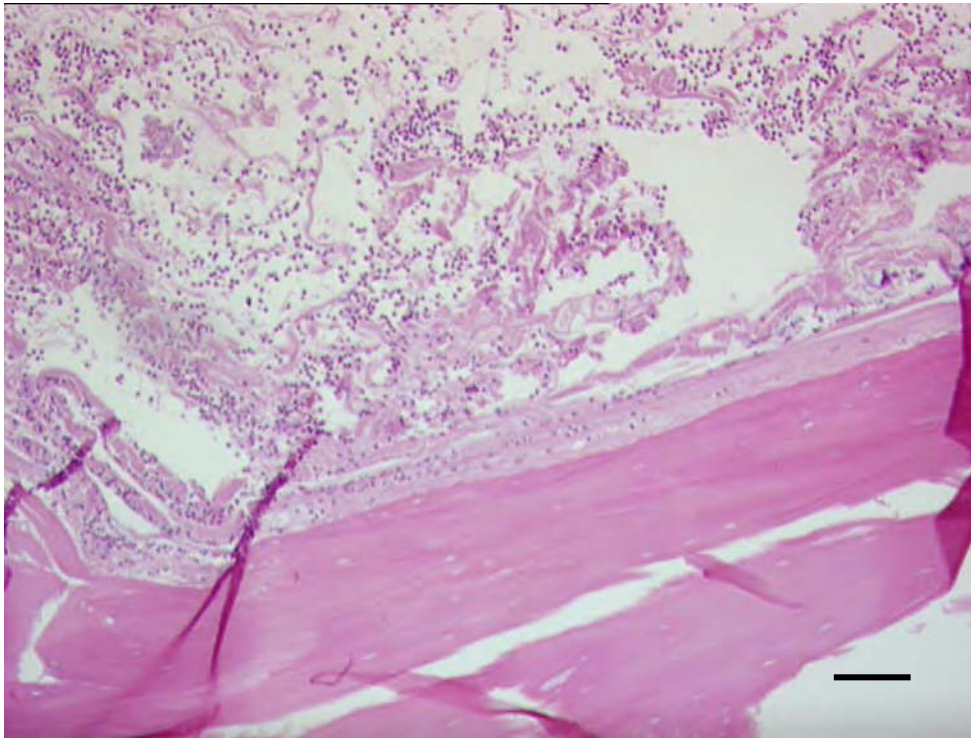


Abbildung 60: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m

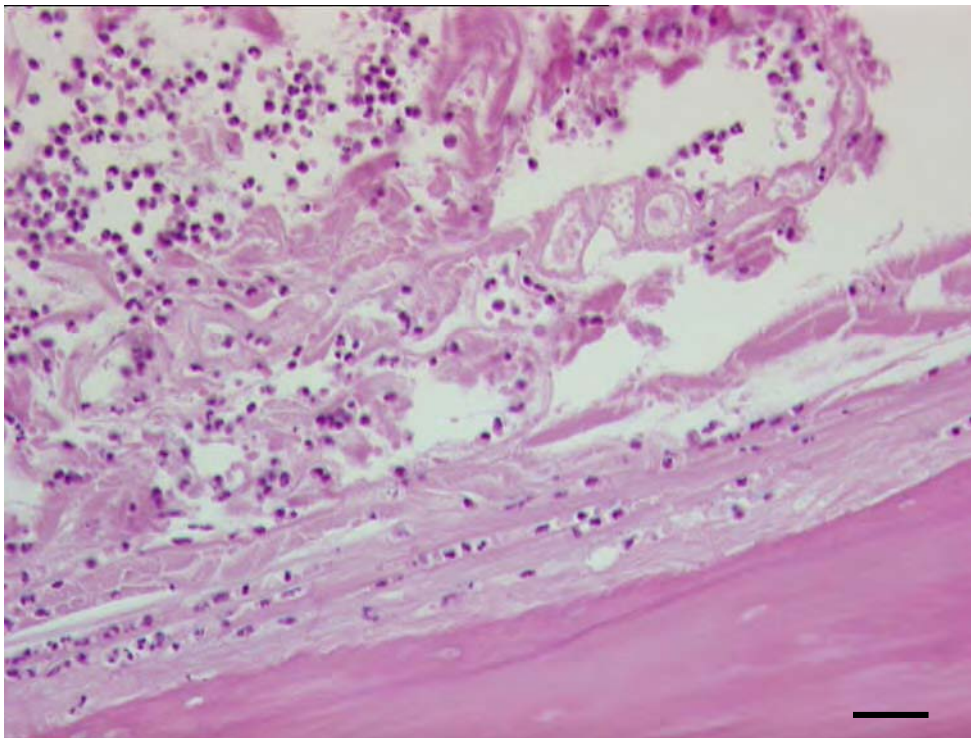


Abbildung 61: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μ m

Randbereiche des Tumors zeigen abgestorbene Knochenbälkchen. Im angrenzenden Weichgewebe finden sich hochgradig ödematöse Auflockerungen und Emigration von

Entzündungszellen. Dazwischen: abgestorbene Zellanteile des Tumors und Fibrinkondensate (Abbildung 60- Abbildung 61).

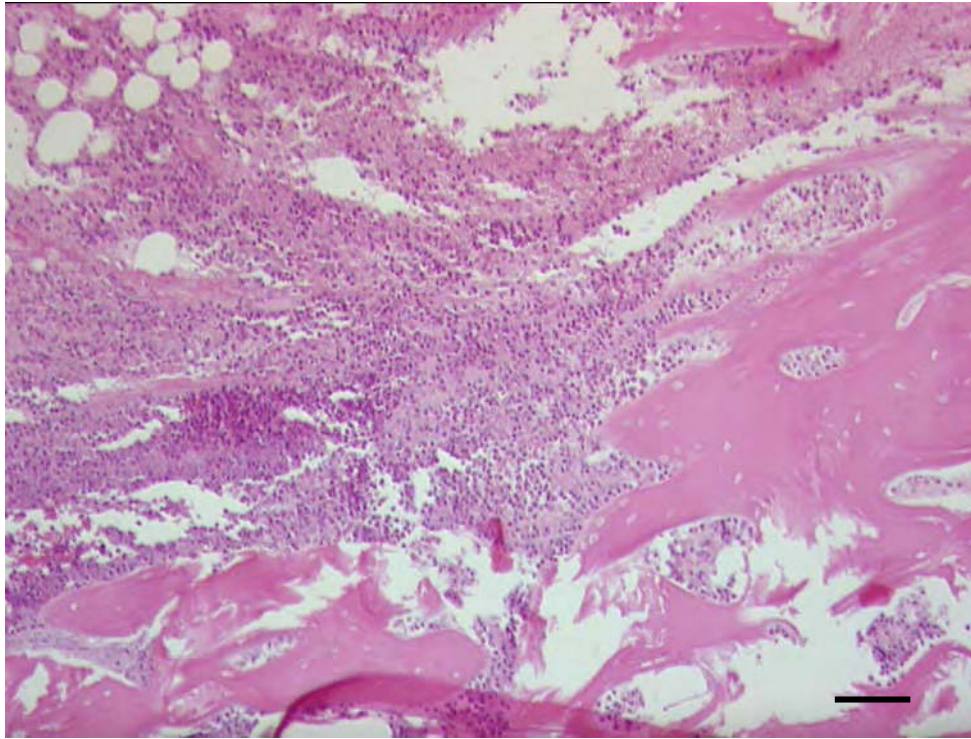


Abbildung 62: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 µm

Starke entzündliche Gewebsreaktion an der Außenfläche im Tumor erhaltener Kortikalisteile zeigt die Abbildung 62. Bei erhaltenen Gefäß- und Faserstrukturen erkennt man wesentlich stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion. Periphere Ausläufer des Osteosarkoms sind nicht erkennbar.

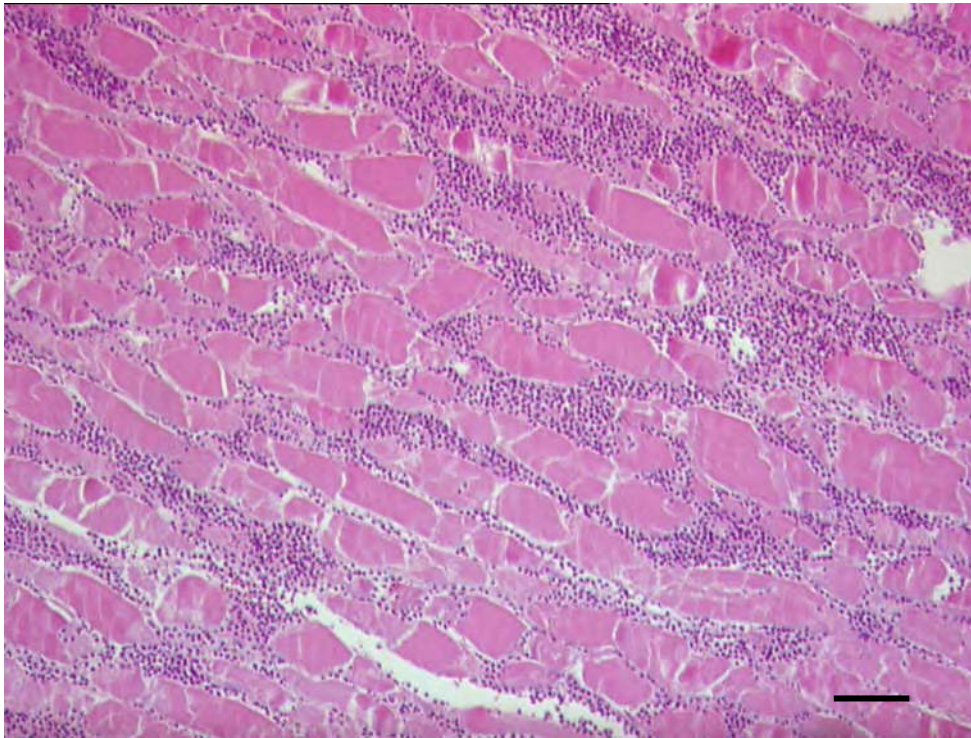


Abbildung 63: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m

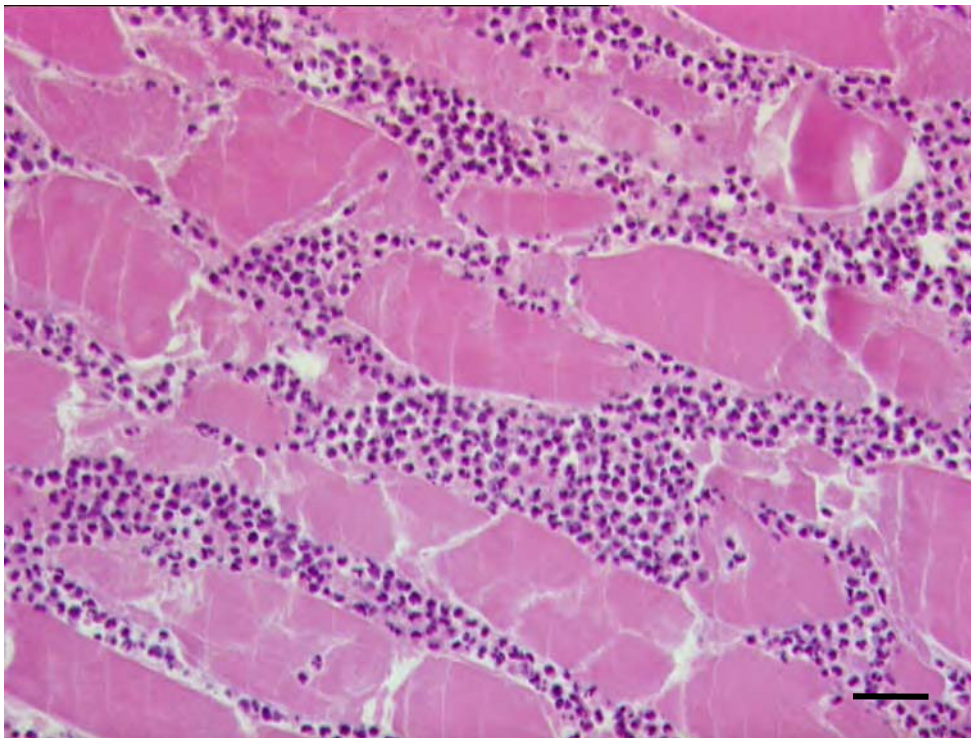


Abbildung 64: Histologisches Schnittpräparat, HE-Färbung. Maßstabsbalken: 50 μ m

Unmittelbar an das Tumorgewebe angrenzende Skelettmuskulatur mit starker leukozytär geprägter Entzündung ist in Abbildung 63 und Abbildung 64 dargestellt. Skelettmuskelfasern sind überwiegend ebenfalls degeneriert oder fortgeschritten nekrotisch. Muskelzellkerne und

Myofibrillenstruktur sind nicht mehr erkennbar (hyalinschollige Degeneration). Vitale Tumorgewebsanteile oder einzelne Tumorzellen sind an keiner Stelle erkennbar.

3.3.2 *Fallbericht 2*

Bernhardiner, weiblich, 10 Jahre alt, 55 kg. Seit etwa ½ Jahr Umfangsvermehrung am rechten distalen Unterarm, von Kollegen als Verkalkung diagnostiziert, keine Vorbehandlung. Befunde: Etwa 15 x 15 cm große Umfangsvermehrung proximal des rechten Karpus, im Röntgenbild etwa 15 x 10 cm große Umfangsvermehrung im Bereich des distalen Radius, Verlust der Kortikalisdicke und Infiltration ins umliegende Weichteilgewebe; nicht gelenkübergreifend. Röntgenbild des Thorax rechts und links anliegend ohne besonderen Befund. Blutbild: normal. Alle Organparameter (Harnstoff, Kreatinin, GPT, GOT, Glucose) im Normbereich. Alkalische Phosphatase geringgradig erhöht. Verdachtsdiagnose: Osteosarkom.

Aufgrund der Größe der Tumormasse musste die Operation als palliative Maßnahme gesehen werden.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Levomethadon und Xylazin via Venenverweilkatheter; eine Antibiose erfolgte präoperativ mit Amoxicillin i. v. und Enrofloxacin s. c. Nach Intubation wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran und Lachgas/Sauerstoff unter Druckbeatmung eingeleitet. Zur Kreislaufstabilisation wurde Ringer-Lactat verabreicht. Die Narkoseüberwachung erfolgte mittels Kapnographie und Pulsoxymetrie; die Blutgase wurden im Abstand von 15 min kontrolliert.

Der operative Zugang erfolgte von dorsomedial. Nach Präparation des Radius wurden im Abstand von 3 cm 6 Bohrlöcher mit einem Durchmesser von 4 mm in den Radius eingebracht; das distale Bohrloch befand sich in unmittelbarer Nähe zum Gelenkspalt, das proximale im Bereich des makroskopisch gesunden Knochengewebes.

Der Frierzyklus wurde dem der Versuchstiere angepasst. Es erfolgten 2 Frierzyklen von jeweils 10-minütiger Dauer; nach dem 1. Frierzyklus wurde das Gewebe aktiv getaut, nach dem 2. Frierzyklus passiv. In der Frierzone wurden Temperaturen von -186° C erreicht. Das umliegende Weichteilgewebe wurde dadurch großflächig mitgefroren inklusive Anteilen der Haut. Nach 45-minütiger Auftauphase erfolgte die Wundnaht in Schichten mit Vicryl 2/0,

Hautnaht mit Seide 3/0. Es wurden Bioptate aus unterschiedlichen Lokalisationen zur histologischen Untersuchung genommen. Diagnose: Osteoblastisches Osteosarkom.

Die Antibiose mit Amoxicillin und Clavulansäure sowie Enrofloxacin wurde für 10 Tage beibehalten, zur Schmerzlinderung erhielt der Patient initial Temgesic und für weitere 10 Tage Carprofen in der Dosierung von 4 mg/kg. Für 10 Tage wurde ein Stützverband angelegt, der bis über das Ellbogengelenk reichte. Verbandswechsel erfolgten alle 3 Tage; alle 6 Wochen erfolgte eine Röntgenkontrolle.

Durch eine Hautnekrose erlitt der Patient eine Infektion mit einem multiresistenten E. coli, die nur schwer zu beherrschen war. Während der gesamten Beobachtungszeit trat eine geringgradige Lahmheit auf, die aber ohne Verabreichung von NSAIDs und ohne größere Einschränkungen für das Tier blieb.

Bereits 6 Wochen post OP konnte eine signifikante Remission der Tumormasse beobachtet werden, die sich nach 12 Wochen post OP in geringem Umfang weiter fortsetzte. Nach der 18-wöchigen Kontrolle sistierte die Tumorremission; eine erneute Ausbreitung des Tumorgewebes konnte aber nicht festgestellt werden (Abbildung 65-Abbildung 71). Aus Kostengründen und aufgrund der in der Literatur kaum signifikant ansteigenden Survival nach Chemotherapie mit Cisplatin wurde auf eine Chemotherapie verzichtet. Der Hund starb unerwartet und plötzlich etwa 24 Wochen post OP. Eine erneute Probeentnahme post mortem verweigerte der Besitzer. Der Wunsch zur Einäscherung des Tieres wurde respektiert.

Fazit: Die Operation verlief ohne Komplikationen. Im postoperativen Verlauf stellte sich eine Nekrose der Haut mit einer schwer zu beherrschenden Infektion ein. Die Röntgenaufnahmen zeigten im Verlauf eine deutliche und anhaltende Remission der Tumormasse. Der Patient war postoperativ in seiner Lebensqualität nur geringgradig eingeschränkt.



Abbildung 65: Röntgen praeoperative Aufnahme laterolateral



Abbildung 66: Röntgen praeoperative Aufnahme dorsoventral

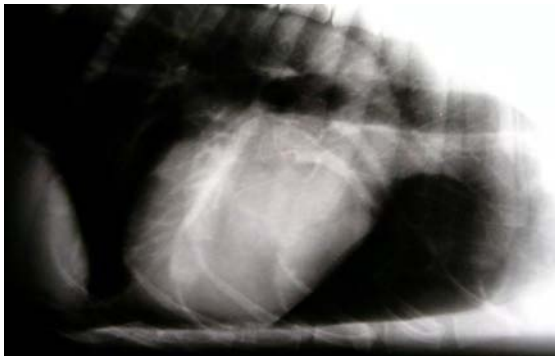


Abbildung 67: Röntgen Thorax praeoperativ laterolateral



Abbildung 68: Röntgen 6 Wochen post OP laterolateral und dorsoventral



Abbildung 69: Röntgen Thorax 6 Wochen post OP laterolateral



Abbildung 70: Röntgen 12 Wochen post OP laterolateral



Abbildung 71: Röntgen Thorax 12 Wochen post OP laterolateral

3.3.3 Fallbericht 3

Vorgestellt wurde eine 8-jährige Greyhoundhündin, weiblich, kastriert. Der Hund zeigte seit einigen Wochen eine rezidivierende Lahmheit hinten rechts. Bei einer röntgenologischen Untersuchung wurde eine Umfangsvermehrung am distalen rechten Femur festgestellt. Der Verlust der Kortikalisdicke und die Lokalisation sprachen für das Vorliegen eines malignen Tumors im Bereich des distalen Femur.

Präoperativ verlief die allgemeine Untersuchung ohne besonderen Befund. Bei der Lahmheitsuntersuchung zeigte sich eine mittelgradige gemischte Lahmheit hinten rechts. Auffallend war eine Umfangsvermehrung im Bereich des rechten Karpus, die aber laut Besitzer schon Jahre bestand und als Arthrose im Karpalgelenk diagnostiziert wurde.

Die Röntgenbefunde des Thorax rechts und links anliegend waren unauffällig (Abbildung 72-Abbildung 73). Rotes Blutbild, weißes Blutbild und Organparameter waren im Normbereich.

Als Prämedikation wurde Diazepam in der Dosierung von 1 mg/kg KG und Levomethadon (Polamivet[®], Intervet) in der Dosierung von 0,4 ml/ kg KG via Venenkatheter verabreicht. Nach Intubation wurde eine Inhalationsnarkose mit Sauerstoff/N₂O und Isofluran unter Druckbeatmung aufrechterhalten. Das Monitoring erfolgte mittels Pulsoxymetrie und Kapnographie sowie Blutgasanalysen im viertelstündlichen Intervall.

Nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes erfolgte standardisierter Zugang zum distalen Femur von lateral und Eröffnung des Kniegelenks mit Luxation der Patella nach medial. Das Femur wurde großzügig freigelegt, um das Weichteilgewebe effektiv schützen zu können. Eine Biopsie des veränderten Gewebes wurde entnommen und zur histologischen Untersuchung gegeben (Diagnose: Osteosarkom).

Im Anschluss wurde das Femur im Bereich des Tumors fenestriert; die Tumormasse wurde abladiert und der Markraum und Tumorweichteile kurettiert. Durch dieses Verfahren konnte die Tumormasse um etwa 80% reduziert werden. Danach erfolgte die intramedulläre Einbringung von Kryosonden proximal und distal der fenestrierten Stelle mit anschließender Frierung des Knochens unter Temperaturkontrolle mittels Messsonden. Der Sicherheitsbereich zum gesunden Knochengewebe im proximalen Bereich betrug mindestens 3 cm. Die Friertemperatur im Sicherheitsbereich betrug während des Friervorgangs mindestens -50° C.

Danach erfolgte ein separater Frierzyklus im Bereich der Fenestrierung mittels Einbringung einer Kryosonde durch die Gegenkortikalis nach Bohrung im Winkel von 90° zum Femur.

Die Länge der Frierzyklen betrug insgesamt 34 Minuten. Zur Erhöhung der Destruktion wurden die Sonden aktiv aufgetaut. Während des Friervorgangs wurde größtmögliche Sorgfalt auf die Schonung des umliegenden Weichteilgewebes durch Wundhaken und -spreizern gelegt.

Nach dem Auftauen des Knochengewebes wurde die Fenestrierung mittels Knochenzement (Palacos) zur Stabilisierung des Femur versiegelt. Der Wundverschluss erfolgte mit Vicryl 2/0 und Seide 3/0 (Abbildung 74-Abbildung 78).

Postoperativ wurde eine Antibiose initial mit Amoxicillin in der Dosierung von 15 mg/kg KG und Marbofloxacin (Marbocyl FD[®], Vetoquinol) in der Dosierung von 2 mg/kg KG intravenös verabreicht. Schmerztherapie erfolgte initial mit Metamizol (Vetalgin[®], Boehringer) in der Dosierung von 50 mg/kg KG intravenös und Temgesic (Human[®], Essex), 1 Ampulle i. m. Die Antibiose wurde für weitere 10 Tage mit Amoxicillin + Clavulansäure (Synulox[®], Pfizer) in der Dosierung von 12,5 mg/kg oral, 2 x täglich fortgesetzt. Als Schmerzmittel wurde Meloxicam (Metacam[®], Boehringer) nach Bedarf verabreicht.

Das Fädenziehen erfolgte 10 Tage post OP beim Haustierarzt. Wundheilungsstörungen wurden nicht festgestellt. Das Allgemeinbefinden und die Futteraufnahme waren gut. Den Besitzern wurde für den Hund Leinenzwang für die nächsten 4 Monate auferlegt.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Strahlendiagnostik der Universität Bern, Schweiz, wurde 14 Tage post OP eine Chemotherapie mit Cisplatin nach Standardprotokoll für Osteosarkome eingeleitet.

Im weiteren Verlauf zeigte der Hund eine zunehmende Schmerzhaftigkeit und komplette Entlastung der betroffenen Hintergliedmaße. Eine Schmerztherapie erbrachte nur unzureichende Besserung. Da der Hund auch nach einer Strahlentherapie weiterhin offensichtliche hochgradige Schmerzreaktionen zeigte, wurde das Tier aus Tierschutzgründen 3 Monate post OP euthanasiert.



Abbildung 72: Röntgen Osteosarkom prae OP/ Kniegelenk laterolateral



Abbildung 73: Röntgen Thorax prae OP laterolateral

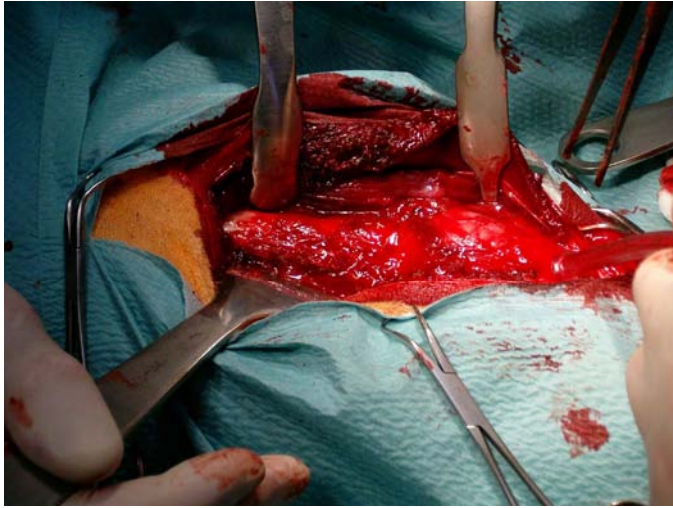


Abbildung 74: Freilegung des Knochentumors



Abbildung 75: Einbringung von Bohrungen zur Platzierung der Kryosonden

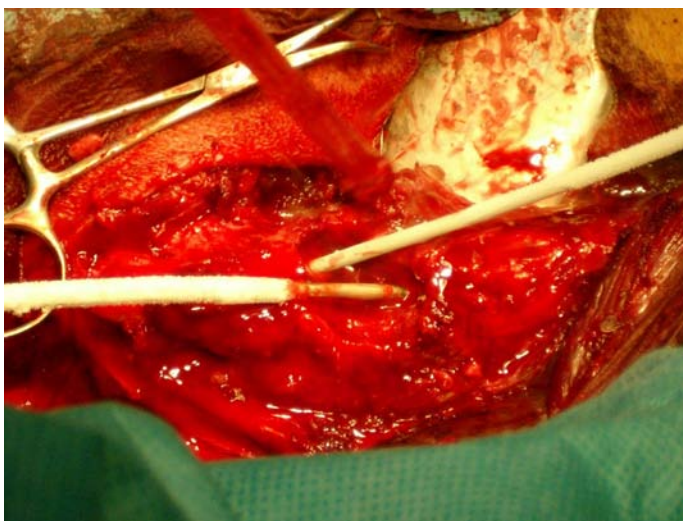


Abbildung 76: Beginn der intramedullären Frierung

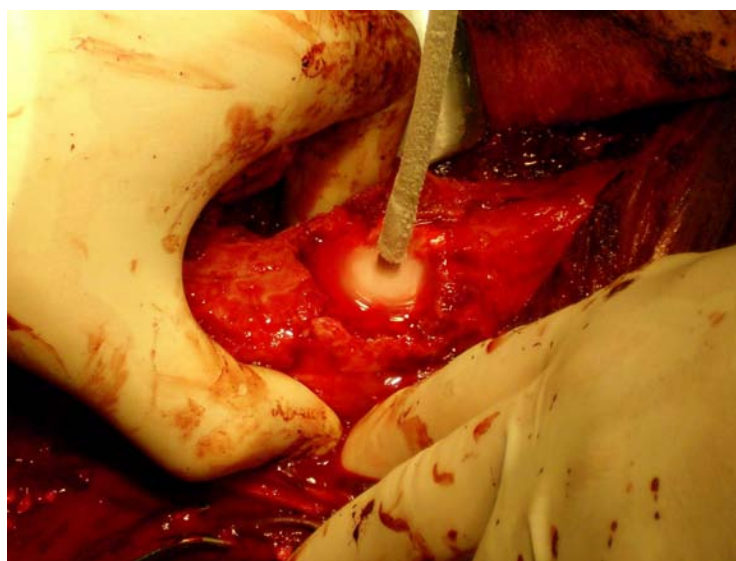
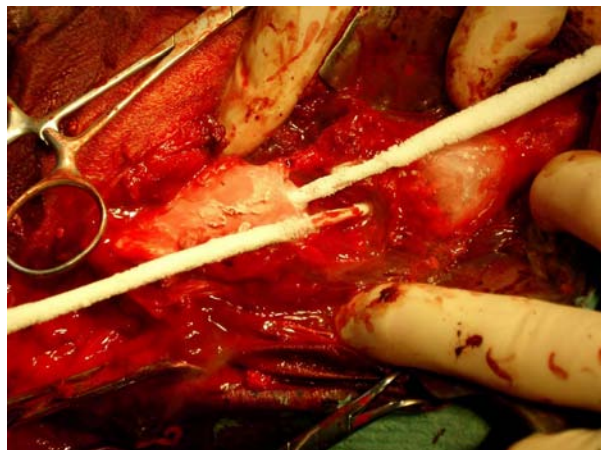
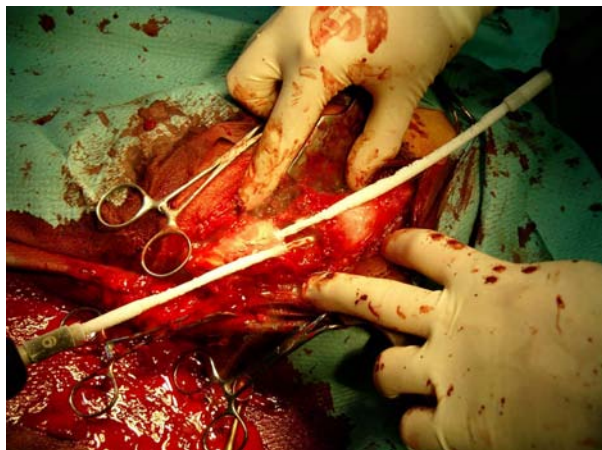


Abbildung 77: Kryosonden in Position und Frierung im Bereich der Fenestrierung

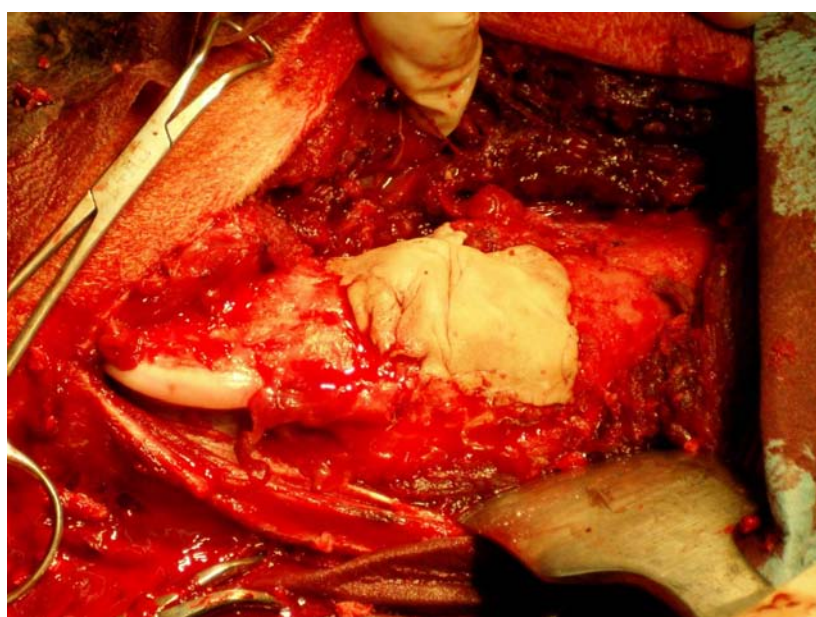


Abbildung 78: Verschluss mit Palacos

4 Diskussion

Nach kryochirurgischer Behandlung treten am Knochengewebe Umbauvorgänge ein, die die Knochenstabilität und -belastbarkeit verändern. Dies lässt sich sowohl im Rahmen der Bruchversuche als auch der begleitenden Histologie gut dokumentieren.

Durch die wenigen Berichte von anderen Arbeitsgruppen, die zum Teil von massiven Stabilitätsproblemen nach kryochirurgischer Behandlung des Knochens im Tierexperiment berichteten, wurde von uns ein relativ kleiner Knochenabschnitt an Femur und Tibia gewählt, der kryochirurgisch behandelt wurde.

Bei einem Versuch von Gage et. al. (1966) traten bei insgesamt 11 von 20 Hunden nach Kryobehandlung am Femur Spontanfrakturen auf, wobei in diesem Fall die gesamte Zirkumferenz des Femurs auf einer Länge von 4,5-7 cm gefroren worden war. Weitere Literaturhinweise von Fisher (1978), Keijser et. al.(2000) und Kerschbaumer et. al., (1984) belegen eine maximale Instabilität des Knochens etwa 8 Wochen nach Kryobehandlung.

Das Ausbleiben von Spontanfrakturen bei den Versuchstieren der vorliegenden Arbeit wird darauf zurückgeführt, dass im Vergleich zu publizierten Arbeiten nur eine vergleichbar kleine Fläche an Tibia und Femur zur kryochirurgischen Behandlung gewählt haben. Des Weiteren ist aber auch hervorzuheben, dass durch die neuartigen Miniaturkryosonden eine sehr gute Steuerbarkeit des Friervorgangs mit einer deutlichen Begrenzung der Knochennekrose zu erreichen ist.

Durch den geringen Durchmesser der Sonden ist es möglich, den Verlust an Knochensubstanz durch Bohrungen zum Einbringen der Sonden zu minimieren. Hierin lag das Problem bei Keijser et. al. (2000), die eine Kryosonde älterer Bauart mit einem größeren Sondendurchmesser verwendeten. Bei 31 Ziegen erlitten 3 Tiere am 42., 61. und 62. Tag post OP Spontanfrakturen.

Die Testung der Tibiakopfkompression gestaltete sich schwierig, da die aufzuwendenden Kräfte bis zum Eintritt der Impressionsfraktur durch die gängige Materialprüfmaschine, die auch am Femur verwendet wurde, nicht aufzubringen waren. Deshalb wurde der Bau einer eigenen Testmaschine notwendig. Da die nötige Kraft bis zum Eintritt der Kompressionsfraktur stark von der Auflagefläche des Stempels beeinflusst wird, wurde die maximale Kompressionsfestigkeit pro Stempelfläche (maximale Spannung) berechnet, um die Werte mit anderen Messungen vergleichbar zu machen.

Besonders im Bereich der Tibia in der 2-Monats-Gruppe zeigte sich am Knochen eine signifikante Schwächung der Kompressionsbelastung 2 Monate post OP. Es ist zu erwarten, dass auch am Femur bei Verwendung einer größeren Knochenfläche eine signifikante Schwächung eingetreten wäre; in diesem Fall jedoch zeigte sich im Bereich des Femurs 2 Monate post OP nahezu die gleiche Festigkeit wie auf der Kontrollseite. Histologisch wird die Schwächung vor allem im Bereich der Tibia durch die vollständige Apoptose des Knochengewebes mit zusätzlicher Nekrose von umliegenden Gewebe (Fett- und Bindegewebe) deutlich. Die Knochenneubildung ist zu diesem Zeitpunkt noch sehr schwach ausgeprägt, zum Teil sind nur Säume mit vitalen Osteoblasten am avitalen Lamellenknochen darstellbar.

Nach 4 Monaten post OP zeigte sich im Bereich der Tibia immer noch eine tendenzielle Schwächung, die aber unterhalb des Signifikanzniveaus liegt. Im Bereich der Femora war die Biegebelastung zwischen Kryoseite und Kontrollseite annähernd gleich.

Sechs Monate post OP war die benötigte Stempelkraft bis zum Eintritt der Kompressionsfraktur der kryoabladierten Seite der Tibia tendenziell höher als die der Kontrollseite. Im Bereich des Femur traten keine nennenswerten Unterschiede auf.

Den praktischen Nutzen am Haustier wird in der zeitlichen Eingrenzung der eingeschränkten Belastbarkeit post OP gesehen.

Man kann sagen, dass die Gefahr von Spontanfrakturen nach Kryoablation von Knochengewebe bis 8 Wochen post OP am höchsten ist und danach stark abnimmt.

Da eine komplette Entlastung einer Gliedmaße wie beim Menschen beim Haustier nicht möglich ist und eine Teilentlastung der betroffenen Gliedmaße mittels Verband sich über einen langen Zeitraum schwierig gestaltet, ist zu fordern, dass bis mindestens 2 Monate post OP eine höchstmögliche Ruhigstellung des Tieres und darüber hinaus bis etwa 4 Monate post OP ein strikter Leinenzwang beim Hund bzw. ausschließliche Wohnungshaltung ohne Möglichkeit des Hoch- bzw. Herabspringens bei der Katze sicherzustellen ist.

4.1 Histologie

Histologisch zeigt sich korrelierend zu den Bruchversuchen eine deutliche Zunahme und Anlagerung vitalen Geflechtknochens an den avitalen Lamellenknochen. Man erkennt die breite Ausbildung neuen Knochengewebes, teilweise mit angrenzender Fibrose. Man kann

davon ausgehen, dass überschießende Reparaturvorgänge für die höhere Stabilität der kryoabladierten Seite verantwortlich sein müssen.

Infolge des kryochirurgischen Eingriffes kommt es im histologischen Bild zu einer vollständigen Apoptose des Knochengewebes im betroffenen Gebiet und einer Nekrose von umliegenden Fett- und Bindegewebe. Teilweise sind Markraumödeme aufgrund der Schädigung zu finden.

Nach 2 Monaten ist eine ausgedehnte Markraumfibrose zu finden. Bereits jetzt beginnt ein Neuanbau von Geflechtknochen an den avitalen Lamellenknochen. Der Umbau setzt sich im zeitlichen Verlauf mit zunehmender Bildung von Geflechtknochen fort. Dabei werden gleichzeitig verbliebene Nekrosereste durch histiozytär-resorptive Reaktionen abgeräumt. Teilweise wurden Entzündungszellinfiltrate nachgewiesen.

Insgesamt kann man davon ausgehen, dass im Operationsgebiet eine vollständige Nekrose des betroffenen Knochengewebes erreicht worden ist. Bereits nach kurzer Zeit beginnt die Regeneration in Form der Anlagerung von Geflechtknochen an den avitalen Knochen. Entzündungsreaktionen scheinen nur gering ausgeprägt zu sein. Ein Markraumödem war nur an einem Präparat nachweisbar. Im zeitlichen Verlauf ist die Größenzunahme des Geflechtknochens (Knochenaufbau) gut dokumentierbar.

4.2 Fallbeispiele

Drei Hunde mit Osteosarkomen, zwei davon im Bereich des distalen Radius und eines im Bereich des distalen Femur wurden kryochirurgisch behandelt. Die Tumormasse bei allen Tieren war erheblich, der Verlauf des Tumors bezog große Teile des betroffenen Knochens ein. In allen Fällen konnte ein Sistieren der Größenzunahme bis hin zur deutlichen Abnahme der Tumormasse beobachtet werden. Histologisch konnte an einem Präparat die vollständige Apoptose der Tumorzellen nachgewiesen werden. Das Allgemeinbefinden der Patienten post OP konnte in zwei Fällen als äußerst zufrieden stellend bezeichnet werden, in einem Fall musste die Behandlung aufgrund zu starker Schmerzreaktionen abgebrochen und das Tier euthanasiert werden.

Bei allen drei Fallberichten bestand die Problematik im Schutz des Weichteilgewebes. Durch zu starke Weichteilschäden im unmittelbaren Bereich des OP-Feldes kam es zu kaum beherrschbaren Haut- und Weichteilinfektionen und -nekrosen, die sich in der Folgebehandlung als äußerst problematisch erwiesen. Betont werden muss, dass diese Fälle

sowohl in Größe als auch in Ausbreitung Sonderfälle darstellen, die chirurgisch wenn überhaupt nur mittels Amputation therapierbar gewesen wären.

Ungelöst bleibt beim kryochirurgischen Eingriff, wie bei allen anderen chirurgischen Verfahren, die Problematik der Metastasierung.

Nach Kessler (1999) werden Knochentumore beim Hund in primäre und sekundäre sowie maligne und benigne Tumore unterteilt. Der Hauptanteil sind primäre maligne Knochentumoren, wovon Osteosarkome einen Anteil von 85% ausmachen. Osteosarkome treten zum weitaus überwiegenden Teil bei großen Hunderassen und dort zu 95% im appendikularen Skelett (Gliedermaßenskelett) auf. Das Durchschnittsalter der betroffenen Tiere beträgt 7 Jahre; die Rasse scheint nicht so bedeutend zu sein wie Größe und Gewicht des Hundes. Die typische Primärlokalisation ist die Metaphyse der langen Röhrenknochen. Ätiologisch werden vor allem Mikrotraumen und Verletzungen der Wachstumszonen als Auslöser für das Entstehen von Tumoren in Verbindung gebracht. Ein viraler Auslöser wird diskutiert, bislang mangelt es jedoch an einem Virusnachweis.

Osteosarkome verhalten sich lokal destruktiv und führen zur Zerstörung von Periost und Kortikalis. Biomechanik und Belastbarkeit können bis hin zu einer pathologischen Fraktur beeinträchtigt sein.

Osteosarkome metastasieren stark hämatogen, vor allem in das Lungengewebe, aber auch in alle anderen Organe sowie in das Knochengewebe.

Klinisch zeigen die Tiere eine zum Teil ausgeprägte Lahmheit und Umfangsvermehrung im Bereich des betroffenen Gebietes. Es kann zu Spontanfrakturen kommen.

Röntgenologisch sind Osteosarkome gut zu diagnostizieren. Typisch ist der ausgeprägte Kortikalisverlust und das Sunburst-Phänomen, bei dem sich das Periost sonnenstrahlartig ausbreitet. Ebenso kann oft ein Codmann'sches Dreieck (Periostneubildung zwischen altem Periost und Kambiumschicht) nachgewiesen werden. Die Diagnosesicherung kann mittels CT oder MRT erfolgen, beweisend ist die Tumorbioptie.

Es stehen verschiedene chirurgische Verfahren zur Behandlung eines Knochentumors zur Verfügung. Als Standardtherapie wird seit Jahren die Amputation der betroffenen Gliedmaße gesehen. Selbst große Rassen kommen problemlos mit einer Amputation zurecht und die Lebensqualität der Tiere ist kaum eingeschränkt. Ohne Chemotherapie beträgt die mediane Überlebenszeit 3-4 Monate.

Eine Extremitäten-erhaltende Therapie ist die limbsparing-Methode entweder mittels eines Allografts (Spenderknochen) oder mittels Palacos (Knochenzement), bei der der tumorbefallene Bereich des Knochens großzügig reseziert und durch ein Implantat überbrückt wird. Stabilität wird über eine Verbundosteosynthese erreicht. Eine weitere Methode ist das limbsparing mittels homologem Autotransplantat (Rippenknochen).

Die Komplikations- und Infektionsrate ist relativ hoch. Die mediane Überlebenszeit ist gleich der der Amputation.

Eine adjuvante chemotherapeutische Behandlung kann die Überlebenszeit signifikant verlängern. Eine Chemotherapie ohne chirurgische Resektion ist aufgrund der Aggressivität des Primärtumors nicht sinnvoll.

Zum Einsatz kommen unterschiedliche Chemoprotokolle hauptsächlich mit Platin-Derivaten. Cisplatin ist nephrotoxisch, so dass eine Diuresebehandlung notwendig ist und myelotoxisch. Carboplatin ist nur wenig nephrotoxisch, jedoch äußerst myelosuppressiv. Die mediane Überlebenszeit beträgt etwa ein Jahr. Doxorubicin kann als Monotherapeutikum oder auch in Kombination mit Platinverbindungen verabreicht werden. Doxorubicin ist kardiotoxisch.

Lokale Chemotherapeutika in Form von Schwämmchen, die im Bereich des resezierten Tumors platziert werden wie auch die direkte Applikation von Cisplatin in den betroffenen Primärtumor führen zu sehr heterogenen Ergebnissen.

Eine Immunotherapie im Anschluss an eine Chemotherapie führt zu signifikant höheren Überlebenszeiten der Patienten. Hierbei wird als Immunmodulator, der eine Erhöhung der tumoriziden Monozytenaktivität hervorruft, in Liposomen eingekapseltes Muramyltripeptid-Phosphatidethanolamin (L-MTP-PE) verwendet.

Die Strahlentherapie wird als palliative Maßnahme angesehen. Da Osteosarkome sehr strahlenresistent sind, kann nur eine weitgehende Schmerzfreiheit für den Patienten erreicht werden. Eine Behandlung besteht aus 3 Fraktionen zu je 8-10 Gy an Tag 0, 7 und 21 oder 5 Fraktionen zu je 4,5 Gy an 5 aufeinander folgenden Tagen.

Insgesamt betrachtet stellt der kryochirurgische Eingriff in Verbindung mit einer folgenden Chemotherapie eine mindestens ebenbürtige chirurgische Variante dar. Es ist die einzige Extremitäten-erhaltende Methode, bei der ohne Resektion eine vollständige Tumorablation erreicht werden kann. Wenn im Bereich des Weichteilschutzes Fortschritte erzielt werden können, stellt die Kryoablation das chirurgische Verfahren mit dem größten Potential dar.

Problematisch bleibt weiterhin die Begrenzung der Frierzone, um umliegendes Weichteilgewebe zu schonen. Gerade im Bereich der distalen Vordergliedmaße ist ein effektiver Weichteilschutz kaum möglich. Die Gefahr von Komplikationen wie Wundinfektionen und Durchblutungsstörungen sowie großflächige Nekrosen im Operationsgebiet ist hoch und kann in Folge dazu führen, dass eine Amputation unumgänglich wird. Im Bereich des Femur ist ein deutlich besserer Weichteilschutz aufgrund großzügiger Präparationsmöglichkeiten gegeben.

Da durch den kryochirurgischen Eingriff bei einem großen Teil der Fälle – besonders bei noch nicht großflächig ausgebreiteten offensichtlichen Tumoren mit hoher Wahrscheinlichkeit eine vollständige Apoptose des betroffenen Gebietes erreicht werden kann, bietet das Kryoverfahren in Kombination mit einer Chemotherapie die beste Möglichkeit zur Gliedmaßen-erhaltenden Therapie.

5 Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines neuartigen kryochirurgischen Verfahrens zur Behandlung von Osteosarkomen als Alternative zu den bisherigen chirurgischen Vorgehensweisen. Durch die Entwicklung neuartiger Miniaturkryosonden können die Steuerung des Friervorgangs und die Kühlleistung optimiert werden. Zur Verwendung kommt ein neuartiges geschlossenes System mit hochleistungsfähigen dünnkalibrigen Kryosonden.

Im Tierversuch wird das kryochirurgische Verfahren im Hinblick auf Knochenstabilität und sicherer Apoptose des behandelten Gewebes untersucht. Alle Versuchstiere erreichen nach dem Eingriff wieder volle Belastbarkeit der betroffenen Gliedmaßen. Spontanfrakturen treten nicht auf.

Die zu behandelnden Knochen werden auf ihre Belastungsfähigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten getestet. Im Bereich des Femur wird ein Biegemoment und im Bereich der Tibia eine Kompressionskraft ausgeübt. Kontrollseite ist das jeweils korrespondierende gesunde Femur bzw. die Tibia. Für die Tibiaprüfung wird ein Gerät zur Belastungsfähigkeit entwickelt.

Die Resultate zeigen eine maximale Instabilität der Tibia und eine geringere, jedoch nicht signifikante Schwächung des Femur 2 Monate post OP, die sich nach 4 Monaten nur noch tendenziell im Bereich der Tibia, jedoch nicht mehr am Femur zeigt. Nach 6 Monaten ist die kryobehandelte Tibia belastbarer als die der Kontrollseite. Erklärbar erscheint dieser Effekt mit einer überschießenden Regeneration und Reparation des Gewebes.

Zur histologischen Aufarbeitung werden alle Tiere in festgelegten Zeitintervallen mit Fluorochrommarkierungen versehen, die es möglich machen sollte, die Regeneration des Gewebes in Abhängigkeit von der Zeit zu dokumentieren. Es wird eine neuartige Technik verwendet, die eine histologische Aufarbeitung der Präparate ohne vorherige Entkalkung ermöglicht. Zum Einsatz kommt die Trenn-Dünnschliff-Technik nicht schneidbarer Materialien nach Donath und Breuner im EXAKT-Trennschleifsystem und EXAKT-Mikroschleifsystem. Es zeigt sich, dass die histologischen Ergebnisse dieser Methode aus verschiedenen Gründen nicht auswertbar sind. Nach Entkalkung und HE- Färbung kann bewiesen werden, dass eine vollständige Apoptose des Knochengewebes im betroffenen Gebiet erzielt werden kann. Die Regeneration des Knochens kann im zeitlichen Verlauf dokumentiert werden.

Des Weiteren werden drei Fallbeispiele vorgestellt. Hierbei werden drei Osteosarkome bei Hunden kryochirurgisch behandelt und im postoperativen Verlauf beobachtet. Trotz unterschiedlicher Verläufe werden Schwachstellen im Verfahren offensichtlich, die hauptsächlich im mangelnden Weichteilschutz beim Friervorgang begründet sind. Die Vorteile liegen in der Remission der Tumormasse bis zum Beweis der vollständigen Apoptose der Tumorzellen.

Die kryochirurgische Behandlung sollte daher in Zukunft eine ernstzunehmende Alternative bei Gliedmaßen-erhaltenden Operationstechniken zur Behandlung von Osteosarkomen an langen Röhrenknochen bei Hunden gesehen werden.

6 Hinweise

6.1 Hinweis auf Teilpublikation

Teile dieser Arbeit wurden 2004 in der Fachzeitschrift „Der Unfallchirurg“ veröffentlicht:

F.Popken, A. Niehoff, F. Emrich, D. Blaecker, M. Bosse, J. Michael, G.-P. Brüggemann, P. Eysel: Stabilitätsveränderungen nach kryochirurgischer Behandlung an langen Röhrenknochen – Eine tierexperimentelle Studie. Unfallchirurg 2004 107:113-117

6.2 Beurteilung Histologie Fallbericht 1

Die histologische Beurteilung der dargestellten Präparate im Fallbericht 1 im Kapitel 3.3.1 („Praktische Anwendung der Kryochirurgie zur Behandlung eines Osteosarkoms“) erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Siegfried Überschar.

7 Literatur

1. Aboulafia, A. J., Rosenbaum, D. H., Sicard-Rosenbaum, L., Jelinek, J. S., Malawer M. M.: Treatment of large subchondral tumors of the knee with cryosurgery and composite reconstruction. Clin Orthop 307: 189 - 189 (1994)
2. Alkalay, D., Kollender, Y., Mozes, M., Meller, I.: Giant cell tumors with intraarticular fracture. Two-stage local excision, cryosurgery and cementation in 5 patients with distal femoral tumor followed for 2-4 years. Acta Orthop Scand 67: 291 - 294 (1996)
3. Athanasian, E. A., McCormack, R. R.: Recurrent aneurysmal bone cyst of the proximal phalanx treated with cryosurgery: a case report. J Hand Surg [Am] 24: 405 - 412 (1999)
4. Arnott, J.: On the treatment of cancer by the regulated application of an anaesthetic temperature. London, J. Churchill (1851)
5. Boons, H. W., Keijser, L. C., Schreuder, H. W., Pruszczynski, M., Lemmens, J. A., Veth R. P.: Oncologic and functional results after treatment of giant cell tumors of bone. Arch Orthop Trauma Surg 122: 17 - 23 (2002)
6. Bradley P. F., Fisher A. D.: The cryosurgery of bone. An experimental and clinical assessment. Br J Oral Surg 13: 111 - 127 (1975)
7. Cooper, I. S.: Cryogenic Surgery. A new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissues. New England J Med 268: 743 - 749 (1963)
8. De Vries, J.: Bone marrow embolism and cryosurgery. Thesis, Groningen, (1983)

9. Fay, T.: Early experiences with local and generalized refrigeration of the human brain. J Neurosurg 16: 239 - 260 (1959)
10. Fisher, A. D., Williams, D. F., Bradley, P. F.: The effect of cryosurgery on the strength of bone. Br J Oral Surg 15: 215 - 222 (1978)
11. Gage, A. A., Greene, G. W., Neiders, M. E., Emmings, F. G.: Freezing bone without excision. An experimental study of bone-cell destruction and manner of regrowth in dogs. JAMA 196: 770-774 (1966)
12. Gage, A. A., Emmings, F. G.: Bone freezing in cryotherapy. J Barnabus Med Center 4: 314-319 (1967 a)
13. Hausamen J. E.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Knochendestruktion und Regeneration am Kaninchenkiefer nach kryochirurgischer Behandlung. Dtsch Zahnärztl Z 28: 836 - 43 (1973)
14. Hewitt, P. M., Zhao, J., Akhter, J., Morris, D. L.: A comparative laboratory study of liquid nitrogen and argon gas in cryosurgery systems. Cryobiology 35: 303-308 (1997)
15. Kerschbaumer, F., Russe, W., Weiser, G., Bauer, R.: Cryolesions of bone. An experimental study. Part I: Examinations in technique of controlled cryolesion on bone. Arch Orthop Trauma Surg 96: 5 - 9 (1980 a)
16. Kerschbaumer, F., Weiser, G., Neuerer, G. Russe, W., Bauer, R.: Cryolesions of bone. An experimental study. Part II: Results of cryosurgery on bone. Arch Orthop Trauma Surg 96: 11 - 14 (1980 b)

17. Kerschbaumer, F., Krösel, P., Schlag, G.: Kryochirurgie des Knochens- Untersuchung zur Hämodynamik und Gewebetemperatur. Beitr Orthop Traumatol 29: 134 - 139 (1982)
18. Kuylenstierna, R., Nathanson, A., Lundquist, P. G.: Effects of cryosurgery on the healing pattern of rabbit mandibular bone. A triple fluorochrome labelling study. Acta Otolaryngol 92: 569 - 574 (1981)
19. Keijser, L. C. M., Schreuder, H. W. B., Buma, P., Weimans, H., Veth, R. P. H.: Cryosurgery in long bones; an experimental study of necrosis and revitalization in rabbits. Arch Orthop Trauma Surg 119: 440 - 444 (1999)
20. Keijser, L. C. M., Schreuder, H. W., Doerwald, N., Keulers, B. J., Buma, P., Hulskes, R., Veth, R. P. H.: Bone strength after cryosurgical treatment of lang bones: an experimental study in the goat. Vortrag. 10th Conference of the European Orthopaedic Research Society, Wiesbaden (2000)
21. Keijser, L. C. M., Van Tienen, T. G., Schreuder, H. W., Lemmens, J. A., Pruszczynski, M., Veth, R. P.: Fibrous dysplasia of bone: management and outcome of 20 cases. J Surg Oncol 76: 157-166, Discussion 167 - 1688 (2001)
22. Keijser, L. C. M., Schreuder, H. W., Boons, H. W., Keulers, B. J., Buma, P., Huiskes, R., Veth, R. P.: Bone grafting of cryosurgically treated bone defects: experiments in goats. Clin Orthop 396: 215 - 22 (2002)
23. Kessler, M: Kleintieronkologie, Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunde und Katzen: 389-407 (1999)
24. Larrey, D. J.: Surgical Memoirs of Campaigns of Russia, Germany and France. Translation by J. C. Mercer, Philadelphia, Carey and Le, Philadelphia 1832, S. 293

25. Lenz H., Preussler, H.: The cryoeffect on the growing bone. *Laryngol Rhinol Otol* 54: 317 - 327 (1975)
26. Malawer, M. M., Marks, M. R., Mc Chesney, D., Piasio, M., Gunther, S. F., Schmookler, B. M.: The effect of cryosurgery and polymethylmethacrylate in dogs with experimental bone defects comparable to tumor defects. *Clin Orthop* 226: 299 - 310 (1988)
27. Malawer, M. M., Dunham, W.: Cryosurgery and acrylic cementation as surgical adjuncts in the treatment of aggressive (benign) bone tumors. Analysis of 25 patients below the age of 21. *Clin Orthop* 262: 42 - 57 (1991)
28. Malawer, M. M., Bickels, J., Meller, I., Buch, R. G., Henshaw, R. M., Kollender, Y.: Cryosurgery in the treatment of giant cell tumor. A long-term followup study. *Clin Orthop* 359: 176 - 188 (1999)
29. Marciani, R. D., White, D. K., Roth, G. I.: Freeze treatment of the monkey mandibular condyle. *J Oral Maxillofac Surg* 44: 50 - 59 (1986)
30. Marcove R. C., Miller, T. R., Cahan, W. C.: The treatment of primary and metastatic bone tumors by repetitive freezing. *Bull N Y Acad Med* 44: 532 - 544 (1968)
31. Marcove, R. C., Miller, T. R.: Treatment of primary and metastatic bone tumors by cryosurgery. *JAMA* 207 (10): 1890 - 1894 (1969 a)
32. Marcove, R. C., Miller, T. R.: The treatment of primary and metastatic localized bone tumors by cryosurgery. *Surg Clin North Am* 49: 421 - 430 (1969 b)

33. Marcove, R. C., Lyden, J. P., Huvos, A. G., Bullough, P. B.: Giant-cell tumors treated by cryosurgery. A report of twenty-five cases. *J Bone Joint Surg Am* 55: 1633 - 1644 (1973)
34. Marcove, R. C., Weis, L. D., Vaghaiwalla, M. R., Pearson R.: Cryosurgery in the treatment of giant cell tumors of bone: a report of 52 consecutive cases. *Clin Orthop* 134: 275 - 289 (1978)
35. Marcove, R. C., Stovell, P. B., Huvos, A. G., Bullough, P. G.: The use of cryosurgery in the treatment of low and medium grade chondrosarcoma. A preliminary report. *Clin Orthop* 122: 147 - 156 (1977 a)
36. Marcove, R. C., Searfoss, R. C., Whitmore, W. F., Grabstald, H.: Cryosurgery in the treatment of bone metastases from renal cell carcinoma. *Clin Orthop* 127: 220 - 227 (1977 b)
37. Marcove, R. C.: A 17-year review of cryosurgery in the treatment of bone tumors. *Clin Orthop* 163: 231 - 234 (1982)
38. Marcove, R. C., Abou Zahr, K., Huvos, A. G., Ogihara, W.: Cryosurgery in osteogenic sarcoma: report of three cases. *Compr Ther* 10: 52 - 60 (1984).
39. Marcove, R. C., Sheth, D. S., Brien, E. W., Huvos, A. G., Healey, J. H.: Conservative surgery for giant cell tumors of the sacrum. The role of cryosurgery as a supplement to curettage and partial excision. *Cancer* 74: 1253 - 1260 (1994)
40. Marcove, R. C., Sheth, D. S., Brien, E. W., Huvos, A. G., Healey, J. H.: Conservative surgery for giant cell tumors of the sacrum. The role of cryosurgery as a supplement to curettage and partial excision. *Cancer*. 74: 1253 - 1260 (1994)

41. Marcove, R. C., Sheth, D. S., Takemoto, S., Healey, J. H. The treatment of aneurysmal bone cyst. Clin Orthop 311: 157 - 163 (1995)
42. Meals, R. A., Mirra, J. M, Bernstein, A. J.: Giant cell tumor of metacarpal treated by cryosurgery. J Hand Surg [Am] 14: 130 - 134 (1989)
43. Mirra, J. M., Rand, F., Rand, R., Calcaterra, T., Dawson, E.: Giant-cell tumor of the second cervical vertebra treated by cryosurgery and irradiation. Clin Orthop 154: 228 - 233 (1981)
44. Müller, C., Micksche, M., Yamagata, S., Kerschbaumer, F.: Therapeutic effect of cryosurgery of murine osteosarcoma. Influence on disease outcome and immune function. Cryobiology 22: 77 - 85 (1985)
45. Oeseburg, H. B., Rogge, C. W., Schraffordt Koops, H., Oldhoff, J.: Cryosurgical treatment of aneurysmal bone cysts. J Surg Oncol 10: 9-20 (1978)
46. Pogrel, M. A.: The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. J Oral Maxillofac Surg 51: 269 - 74 (1993)
47. Pogrel, M. A., Regezi, J. A., Fong, B., Hakim-Faal, Z., Rohrer, M., Tran, C., Schiff, T.: Effects of liquid nitrogen cryotherapy and bone grafting on artificial bone defects in minipigs: a preliminary study. Int J Oral Maxillofac Surg 31: 296 - 302 (2002)
48. Popescu, V., Spirescu, I. E.: Bone resection, extra-corporal cryotherapy and immediate re-implantation in the treatment of mandibular tumours. J Maxillofac Surg 8: 8 -16 (1980)

49. Popken, F., Seifert, J. K., Engelmann, R., Dutkowski, P., Nassir, F., Junginger, T.: Comparison of iceball diameter and temperature distribution achieved with 3-mm accuprobe cryoprobes in porcine and human liver tissue and human colorectal liver metastases in vitro. *Cryobiology*, Vol 40: 302 - 310 (2001)

50. Popken, F., Land, M., Erberich, H., Bosse, M., König, D. P., Eysel, P.: The use of a new miniature cryoprobe for ablation of bone tissue: in vivo assessment of the probe and application of the method to bone in a sheep model. *BMC surgery*, 3, 3 (2003)

51. Popken, F., Land, M., Bosse, M., Erberich, H., Meschede, P., König, D. P., Fischer, JH., Eysel, P.: Cryosurgery in long bones with new miniature cryoprobe : an experimental in vivo study of the cryosurgical temperature field in sheep. *Europ J Surgical Oncol* 29: 542 - 547 (2004)

52. Robinson, D., Halperin, N., Nevo, Z.: Two freezing cycles ensure interface sterilization by cryosurgery during bone tumor resection. *Cryobiol* 43: 4 - 10 (2001)

53. Russe, W., Kerschbaumer, F., Bauer, R.: Kryochirurgie in der Orthopädie. *Orthopäde* 13: 142 - 150 (1984)

54. Sampson, D. E., Pogrel, M. A.: Management of mandibular ameloblastoma: the clinical basis for a treatment algorithm. *J Oral Maxillofac Surg* 57: 1074 - 1077, discussion 1078 - 1079 (1999)

55. Salmassy, D. A., Pogrel, M. A.: Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 784 - 790 (1995)

56. Schmidt, B. L., Pogrel, M. A. :The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. J Oral Maxillofac Surg 59: 720 – 725, discussion 726-727 (2001)

57. Schneider, U. A.: Experimentelle Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von Röhrenknochen nach Kältebehandlung im Epiphysenbereich. Orthopäde 10: 13 - 18 (1981)

58. Schreuder, H. W. C., Conrad 3rd E. U., Bruckner, J. D., Howlett, A. T., Sorensen, L. S.: Treatment of simple bone cysts in children with curettage and cryosurgery. J Pediatr Orthop 17: 814 - 820 (1997 a)

59. Schreuder, H. W. C., van Beem, H. B., Veth, R. P.: Venous gas embolism during cryosurgery for bone tumors. J Surg Oncol 3: 196 - 200 (1995)

60. Schreuder, H. W. C., Pruszczynski, M., Veth, R. P., Lemmens, J. A.: Treatment of benign and low-grade malignant intramedullary chondroid tumours with curettage and cryosurgery. Eur J Surg Oncol 24: 120 - 126 (1998)

61. Sheth, D. S., Healey, J. H., Sobel, M., Lane, J. M., Marcove, R. C.: Giant cell tumor of the distal radius. J Hand Surg [Am] 20: 432 - 440 (1995)

62. Tytus J. S.: Further observations on rapid freezing and its possible application to neurosurgical techniques. Bull Mason Clin 15: 51 - 61 (1961).

63. White, A. C.: Possibilities of liquid air to the physician. J Am Med Assoc 36: 426 - 429 (1901)

64. Wittig, J. C., Simpson, B. M., Bickels, J., Kellar-Graney, K. L., Malawer, M. M.: Giant cell tumor of the hand: superior results with curettage, cryosurgery, and cementation. *J Hand Surg [Am]* 26: 546 - 555 (2001)
65. Yun, Y. H., Kim, N. H., Han, D. Y., Kang, E. S.: An investigation of bone necrosis and healing after cryosurgery, phenol cautery or packing with bone cement of defects in the dog femur. *Int Orthop* 17: 176 - 183 (1993)

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ap	anterior-posterior
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
etc.	et cetera
Fig.	Figur
Fa	Firma
ggr.	geringgradig
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
Gy	Gray
Hz	Hertz
i.v.	intravenös
K _f	molale Gefrierpunktkonstante
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KJ	Kilojoule
kN	Kilonewton
L-MTP-PE	Muramyltripeptid- Phosphatidethanolamin
ll	laterolateral

m	Molalität
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm/min	Millimeter pro Minute
mm/sec	Millimeter pro Sekunde
mol/kg	Mol pro Kilogramm
MW	Mittelwert
N	Newton
N/kg	Newton pro Kilogramm
nm	Nanometer
Nm	Newtonmeter
Nm/kg	Newtonmeter pro Kilogramm
NSAID	non steroidal antiinflammatory drugs
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
P	Dampfdruck
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa	Pascal
post OP	post operationem
prae OP	prae operationem
pro inj.	pro injectionem
s.c.	subcutan
Tab.	Tabelle
T ₀	äquilibrierter Gefrierpunkt

U/l	Units pro Liter
X	molare Fraktion
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

9 Danksagung

Nach Abschluss dieser Arbeit möchte ich diejenigen erwähnen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Arnhold am Institut für Anatomie im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und Herrn Prof. Koebke am Institut für Anatomie II der Universität Köln für das Interesse und die Übernahme dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Frank Popken für die Überlassung des Themas, die jahrelange Betreuung und Beratung bei der Entstehung der Dissertation und die hervorragende Zusammenarbeit über einen solch langen Zeitraum.

Überdies auch herzlichen Dank an alle Mitglieder der Forschungsgruppe Kryochirurgie, besonders Peter, Murat, Marc, Andreas, Matthias und Helge, die zum Teil in nächtelanger Arbeit zum Gelingen des Gesamtprojekts wesentlich beigetragen haben. Dank auch an die Ärzte beim MRT für die nächtlichen Überstunden.

Herrn Prof. Fischer und meinen tierärztlichen Kolleginnen Claudia, Mafalda und Sabine danke ich für die herzliche Aufnahme am Institut für Experimentelle Medizin der Universität Köln, die wissenschaftliche und medizinische Betreuung und das Vertrauen, die tierärztliche Versorgung der Versuchstiere weitestgehend auf mich zu übertragen, so dass keine zeitlichen Engpässe entstanden sind.

Dank geht nicht zuletzt auch an Prof. Brüggemann, Anja Niehoff und Dr. Frank Emrich am Institut für Biomechanik der Sporthochschule Köln und dem Feinmechaniklabor der Sporthochschule Köln für die maßgebliche Beratung und Unterstützung. Ohne sie wäre die Durchführung und Auswertung der Bruchversuche nicht möglich gewesen.

Dem Institut für Pathologie danke ich für die Unterstützung zur Erstellung der histologischen Präparate der Fallberichte. Dr. Caspers herzlichen Dank für die Beratung bei der Auswertung der Histologie im Hauptteil.

Weiterhin sei dem Institut für Zahnmedizin der Universität Köln und dem Institut für Anatomie II der Universität Köln für die Benutzung des EXAKT-Schleifsystems Dank gesagt. Vielen Dank auch an Frau Knifka, die jederzeit wertvolle Tipps und Hilfestellungen parat hatte, wenn es um Fragen und Probleme jedweder Art rund um das Thema Histologie ging.

Lieben Dank an Michaela für die Unterstützung und das Korrekturlesen.

Meiner Frau danke ich für die ideelle Unterstützung, die große Geduld und das entgegengebrachte Verständnis, die das Gelingen dieser Arbeit möglich machten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5389-3

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 178383519538951